

Markus Mustonen

# Keskitisleiden mikrobimääritysmenetelmien vertailu

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

2.12.2015

Tekijä Otsikko	Markus Mustonen Keskitisleiden mikrobimääritysmenetelmien vertailu
Sivumäärä Aika	36 sivua + 1 liite 2.12.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaajat	Tutkintovastaava Jarmo Palm Asiantuntija Kati Sandberg - Lentopolttoaineet
<p>Mikrobikontaminaatio polttoaineessa voi aiheuttaa lukuisia ongelmia polttoainejärjestelmissä ja -säiliöissä, kuten esimerkiksi säiliöiden pintojen korroosiota sekä järjestelmien suodattimien tukkeutumista. Polttoainejärjestelmään kohdistuvien ongelmien lisäksi merkittävä mikro-organismien aiheuttama kontaminaatio vaikuttaa polttoaineen koostumukseen, jolloin polttoaineen laadulliset ominaisuudet heikentyvät. Polttoaineille tulisi suorittaa säännöllistä monitorointia mikrobipitoisuuksien suhteen, jolloin mahdollinen korkea kontaminaatiotaso havaittaisiin ja sen edellyttämiin toimenpiteisiin voidaan ryhtyä nopeasti.</p> <p>Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää rutiinikäyttöön soveltuvien testimenetelmien vertailemalla neljää keskitisleille suunnattua mikrobimääritysmenetelmää. Määritysmenetelmistä kaksi olivat inkubaation edellyttävää menetelmää (IP385, MicrobMonitor<sup>2</sup>) ja kaksi pikatestimenetelmää (HY-LITE, Fuelstat Resinae+).</p> <p>Työssä määritettiin yhteensä 46 keskitislenäytteen (Jet A-1, Diesel) mikrobipitoisuus jokaisella vertailtavalla testimenetelmällä. Saatujen tulosten perusteella vertailtiin menetelmien ominaisuuksia sekä keskinäisiä riippuvuussuhteita. Lisäksi pohdittiin menetelmien käyttökokemukseen liittyviä seikkoja, kuten helppokäyttöisyyttä ja määrittämiseen kuluva aikaa.</p> <p>Menetelmien erilaiset kemialliset taustat ja toimintaperiaatteet sekä mikrobiologisiin määrittäyksiin liittyvä suuri mittausepävarmuus vaikeuttivat suoraan tulosten pohjalta suoritettavaa vertailua. Näin ollen vertailussa painotettiin hieman alun perin suunniteltua enemmän menetelmien käyttökokemukseen liittyviä ominaisuuksia.</p> <p>Saatujen tulosten sekä menetelmien ominaisuuksien vertailun perusteella maljakasvatusmenetelmä IP385 osoittautui soveltuvimmaksi mikrobimääritysmenetelmäksi rutiinikäyttöön. Kasvatusmenetelmässä käytettävä viiden vuorokauden inkubaatioaika estää kuitenkin nopean kontaminaatiotason määrittämisen, minkä vuoksi HY-LITE-pikatestimenetelmän käyttöä IP385-menetelmän rinnalla ehdotettiin, jolloin äkillisissä, korkean mikrobikontaminaatiotason epäilyissä saataisiin nopeasti varmistus epäilylle, ja mahdollisiin toimenpiteisiin voitaisiin ryhtyä välittömästi.</p>	
Avainsanat	mikrobikontaminaatio, keskitisle, mikrobimääritysmenetelmä, IP385, MicrobMonitor <sup>2</sup> , HY-LITE, Fuelstat Resinae+

Author Title	Markus Mustonen Comparison of microbial assay methods on middle distillates
Number of Pages Date	36 pages + 1 appendix 2.12.2015
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Jarmo Palm, Head of Degree Programme Kati Sandberg, Associate - Aviation Fuels
<p>Microbial contamination in fuels can cause a number of problems with the fuel systems and fuel tanks such as tank surface corrosion and filter clogging. In addition, a contamination induced by micro-organisms affects the composition of the fuel which can lead to the qualitative deterioration of fuel. Fuels should be monitored regularly so that the potential high levels of microbial contamination can be detected and necessary actions can be quickly taken.</p> <p>The objective of this thesis was to find out the most suitable microbial assay method by comparing four different test methods. Two of the middle distillates directed test methods required incubation of several days (IP385, MicrobMonitor<sup>2</sup>) while other two methods were quick tests (HY-LITE, Fuelstat Resinae+).</p> <p>In total of 46 middle distillate samples (Jet A-1, Diesel) total microbes in every assay methods were determined. Based on the results the characteristics of the assay methods were compared and correlations between the methods were tested. In addition, aspects of the user experience such as ease of use and time of determination were discussed.</p> <p>Different chemical backgrounds and principles of the assay methods as well as a large measurement uncertainty associated with the microbiological methods complicated the direct comparison of the results. For this reason the comparison focused on slightly more to the evaluation of the user experience than originally planned.</p> <p>Based on the results obtained and the comparison of characteristics of the methods the incubation requiring method IP385 turned out to be the best assay method for routine use. However, a five-day incubation prevents the rapid determination of microbial contamination. For this reason it was suggested that the rapid test method HY-LITE could be used alongside IP385 in cases there's sudden suspect of high level contamination. In such cases, suspicion would get confirmed rapidly and necessary actions could be carried out immediately.</p>	
Keywords	microbial, contamination, assay method, middle distillate, incubation, quick test

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Öljynjalostusprosessi	2
2.2	Mikrobikontaminaatio	4
2.2.1	Mikrobien kierto ja elinehdot polttoaineissa	4
2.2.2	<i>Hormoconis resinae</i> -mikrobi	6
2.2.3	Kontaminaation aiheuttamat tuote- ja turvallisuusriskit	7
2.2.4	Biosidit	9
2.3	Mikrobimääritysmenetelmät	10
2.3.1	MicrobMonitor <sup>2</sup> (IP 613/14)	11
2.3.2	IP 385/99	12
2.3.3	HY-LITE <sup>®</sup>	13
2.3.4	Fuelstat <sup>®</sup> Resinae+	16
3	Menetelmien vertailu	18
3.1	Työn suoritus	18
3.1.1	Näytteenotto ja esikäsittelytoimenpiteet	18
3.1.2	Kontaminaationäyte vertailumateriaalina	20
3.1.3	Säilytysnäytteet	20
3.2	Tulokset	22
3.2.1	Määritystulokset	22
3.2.2	Menetelmien raja-arvot	24
3.3	Tulosten tarkastelu	25
3.3.1	Menetelmien välinen korrelaatio	26
3.3.2	Menetelmiin liittyvät virhelähteet	28
3.3.3	Menetelmien soveltuvuus rutiinikäyttöön	32
4	Yhteenveto	34
	Lähteet	35

## Liitteet

Liite 1. IP385/99-menetelmän luottamusvälitaulukko 95 %:n luottamustasolla

## Lyhenteet

ASTM	<i>American Society for Testing and Material</i> , kansainvälinen standardisoimisjärjestö
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> , adensiinitrifosfaatti
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> , pesäkkeen muodostava yksikkö
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i> , Euroopan kemikaalivirasto
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i> , rasvahapon metyyliesteri
FSII	<i>Fuel system icing inhibitor</i> , polttoaineissa käytettävä jäätymisenestoaine
<i>H.res</i>	<i>Hormoconis resinae</i> , yleinen polttoaineessa esiintyvä homemikrobilaji
IATA	<i>International Air Transport Association</i> , kansainvälinen ilmakuljetusliitto
IP	<i>Institute of Petroleum</i> , öljyteollisuuden tukijärjestö
MEA	<i>Malt extract agar</i> , mallasuuteagar
MFT	<i>Membrane filter technique</i> , kalvosuodatusmenetelmä
MIC	<i>Microbiologically induced corrosion</i> , mikro-organismien aiheuttama korroosio
RLU	<i>Relative Light Unit</i> , suhteellinen valoyksikkö
TPC	<i>Total Plate Count</i> , lopullinen pesäkeluku
TSA	<i>Tryptone soy agar</i> , tryptoni-soija-agar
SRB	<i>Sulphate Reducing Bacteria</i> , sulfaatinpelkistäjäbakteerit

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Neste Oyj:n Porvoon jalostamon keskuslaboratoriossa kevään ja kesän 2015 aikana. Työssä tutkittiin eri polttoainenäytteiden mikrobipitoisuuksia neljällä määritykseen soveltuvalla testimenetelmällä.

Mikrobikontaminaatio polttoaineessa voi aiheuttaa lukuisia ongelmia polttoainejärjestelmissä ja -säiliöissä, kuten esimerkiksi säiliöiden pintojen korroosiota sekä järjestelmien suodattimien tukkeutumista. Laajan kontaminaation aiheuttamia tyypillisiä haittoja ovat polttoaineen koostumuksen muutokset, jolloin polttoaineen laadulliset ominaisuudet heikentyvät, sekä polttoainejärjestelmien käyttöikä lyhenee. Laaja mikrobikontaminaatio on taloudellisten menetysten lisäksi myös merkittävä turvallisuusriski.

Mikrobien aiheuttamia ongelmia polttoainejärjestelmissä on raportoitu 1930-luvulta lähtien. Kontaminaatiotapaukset ovat yleistyneet merkittävästi viime vuosikymmenten aikana. Osaksi ongelmien kasvu voi selittyä polttoaineissa käytettävillä lisäaineilla, jotka voivat toimia ravintona mikrobeille. Kuitenkin merkittävin syy raportoitujen tapausten kasvuun lienee mikrobikontaminaatoriskin tiedostaminen, jolloin ongelmaa osataan epäillä herkemmin. Vuodesta 2002 lähtien öljyteollisuudessa sekä ilmailualalla on suoritettu säännöllistä monitorointia mikrobikontaminaatioiden havaitsemiseksi [1, 2].

Opinnäytetyön tavoitteena on vertailla neljää mikrobimääritysmenetelmää, ja saatujen tulosten sekä menetelmien ominaisuuksien pohjalta selvittää määritykseen parhaiten soveltuva testimenetelmä. Soveltuvimman menetelmän selvittämiseen sisältyy pohdintaa menetelmien käytettävyydestä sekä vertailua menetelmillä saatujen tulosten pohjalta. Vertailussa ei oteta huomioon kustannuksiin liittyviä seikkoja. Työn tavoitteisiin kuuluu myös kattava lentopetroli- ja dieselpolttoainesäiliöiden monitorointi mikrobipitoisuuksien osalta.

## 2 Teoria

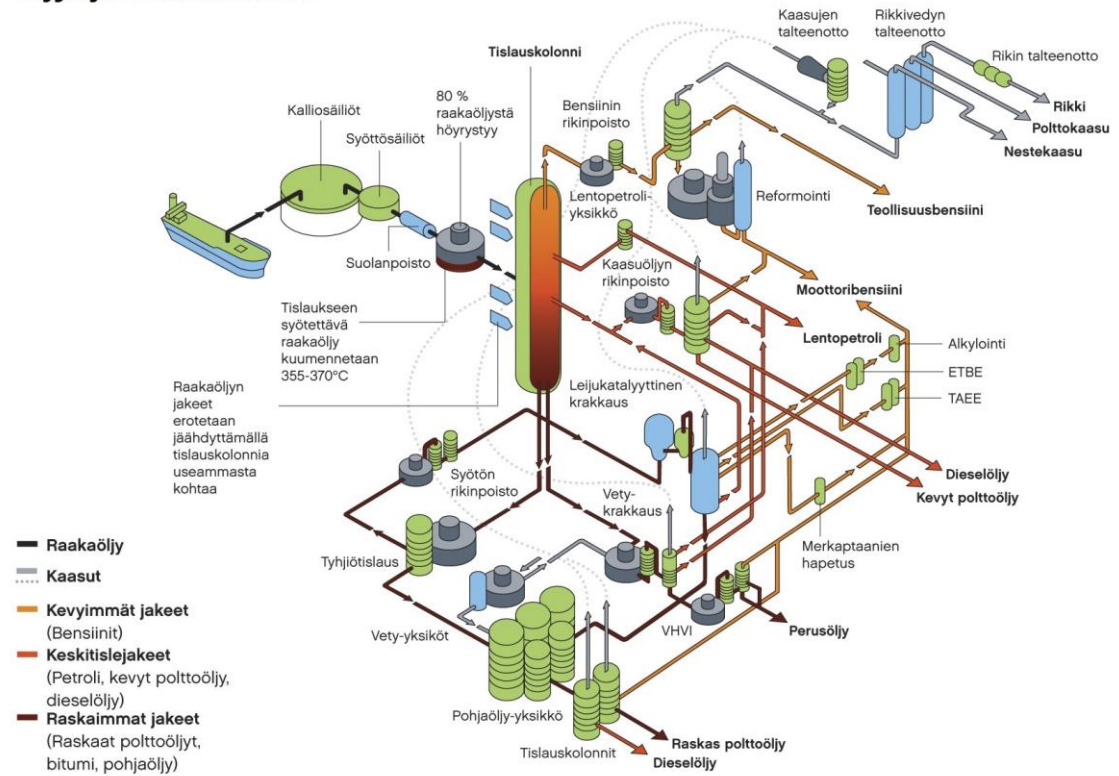
### 2.1 Öljynjalostusprosessi

Öljynjalostuksessa tuotetaan lukuisia erilaisia öljytuotteita useisiin käyttötarkoituksiin, kuten liikennekäyttöön sekä eri teollisuuden aloille. Pääasiallisena lähtöaineena toimii raakaöljy, joka on erikokoisten hiilivetyjen ja muiden yhdisteiden, kuten rikkiyhdisteiden seos. Raakaöljyn sisältämät hiilivetymolekyylit erotellaan toisistaan tislausjakeiksi hiilivetyjen kiehumispisteiden mukaan. Tislausjakeita voidaan käyttää sellaisenaan, jalostaa eteenpäin tai sekoittaa muihin öljytuotekomponentteihin.

Jakeiden ominaisuuksia muokataan fysikaalisten ja kemiallisten prosessien avulla. Jalostuksen päävaiheita ovat tislaus, krakkkaus, rikinpoisto ja reformointi. Krakkauksessa pitkät hiilivetyketjut pilkotaan pienemmiksi katalyytin, vedyn tai lämmön avulla, jolloin raakaöljyn raskaimmista hiilivedyistä saadaan tuotettua arvokkaampia kevyempiä jakeita. Rikinpoistossa raakaöljyjakeista poistetaan rikki, joka muutetaan alkuainerikiksi kemian- ja metsäteollisuuden käytettäväksi. Reformoinnilla tarkoitetaan moottoribensiinin oktaaniluvun nostoa, joka nostaa bensiinin puristuskestävyyttä. Kuvassa 1 on esitetty Neste Oyj:n öljynjalostuskaavio, jossa on havainnollistettu öljynjalostuksen eri prosessivaiheet raakaöljystä tuotekomponenteiksi.

Lopputuotteiden valmistuksessa öljytuotteet valmistetaan valmiiden reseptien mukaan, jolloin öljytuotteeseen lisätään prosessissa saatuja muita komponentteja sekä erilaisia lisäaineita. Lisäaineilla parannetaan tuotteen ominaisuuksia ja toimivuutta, kuten esimerkiksi polttoaineen kylmänsieto-ominaisuuksia. [3.]

## Öljynjalostuskaavio



Kuva 1. Neste Oyj:n Porvoon jalostamon öljynjalostuskaavio [3].

Tislauksessa eroteltujen keskitislejakeiden (petroli, kevyt polttoöljy ja dieselöljy) tislausalue on noin 180 – 360 °C. Keskitisleiden tislausjakeet ovat 9 – 22 hiiliatomin kokoisia hiilivetyketjuja, jossa petroli (hiililukualueeltaan C9-C16) on kevyin ja dieselöljy (hiililukualueeltaan C15-C22) raskain keskitisle.



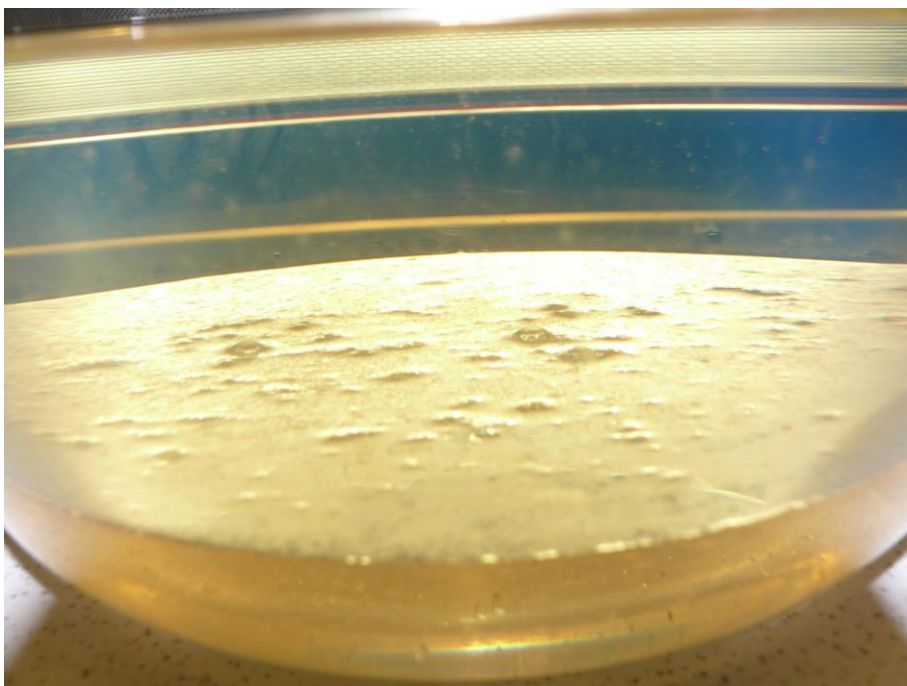
## 2.2 Mikrobikontaminaatio

Mikrobikasvustoa havaittiin öljytuotteissa ensimmäisen kerran jo vuonna 1895 [4]. Mikrobieen aiheuttamia ongelmia polttoaineissa ja polttoainejärjestelmissä on raportoitu säännöllisesti 1930-luvulta lähtien ja useampia lento-onnettomuuksia on liitetty suoraan mikrobikontaminaation aiheuttamiksi 1950-luvulta lähtien. 2000-luvulta lähtien mikrobistasojen monitorointia on suoritettu säännöllisesti öljyteollisuudessa sekä ilmailualalla tarkoituksena puuttua ongelmaan ennaltaehkäisevästi, jolloin kontaminaatiosta aiheutuvat toimet eivät ehdi vaikuttamaan operatiiviseen toimintaan. [2.] Neste Oyj:n Porvoon jalostamolla polttoainesäiliöiden mikrobistasojen monitorointia suoritetaan säännöllisesti.

Polttoaineissa esiintyviin mikro-organismeihin lukeutuvat bakteerit, rihmasienet (homeet) ja hiivasienet. Polttoaineissa esiintyvä mikrobidiversiteetti on varsin laaja. Yhteensä 125 eri mikrobilajia on eristetty polttoainematriisista. Näistä kuitenkin vain 30 lajin on todettu kykenevän lisääntymään ja käyttämään polttoaineen hiilivetyjä ravintonaan. [5.] Mikrobikontaminaation selvittämisessä ja polttoaineen mikrobipitoisuuden määrittämisessä ei yleensä olla kiinnostuneita eri mikrobilajien esiintyvyydestä vaan mikrobien kokonaispitoisuudesta.

### 2.2.1 Mikrobien kierto ja elinehdot polttoaineissa

Vesi on merkittävin elinehto mikrobien selviämiseksi ja kasvulle polttoainematriisissa. Jalostusprosessin jälkeen tisleet voivat sisältää pieniä määriä vettä, mikä edesauttaa kontaminaation aiheutumista. Tuotteen sisältämä sekä järjestelmän ulkopuolelta, muun muassa ilmasta säiliön pinnoille kondensoitunut vesi, sekoittuvat polttoainetuotteeseen. Polttoainesäiliössä neste jakaantuu orgaaniseen ja epäorgaaniseen faasiin, jolloin veden ollessa hiilivetyjä raskaampaa, kerääntyy vesi säiliön pohjalle. Syntynyt vesi- ja öljyfaasin rajapinta on otollinen mikrobien kasvulle, sillä mikrobit käyttävät ravinnonlähteenään polttoaineen hiilivetyjä, kun taas vesi toimii kasvualustana. Kuvassa 2 on esitetty polttoaine- ja vesifaasin rajapinnassa havaittua mikrobikasvustoa. Irtoveden lisäksi esimerkiksi polttoainesäiliöiden pinnat toimivat kasvualustana. [6.]



Kuva 2. Polttoaine- ja vesifaasin rajapinnassa esiintyvää mikrobikasvustoa.

Vesifaasin on arvioitu sisältävän noin 1000-kertaisen määrän mikrobeja verrattuna polttoaineefaasiin. Mikro-organismit päätyvät polttoaineeseen maaperästä, ilmasta, saastuneesta pesuvedestä, kontaminoituneesta putkistosta sekä polttoainesäiliöiden pintoihin jääneestä biofilmistä, jos säiliötä ei ole riittävän hyvin puhdistettu. [6.]

Mikrobit voidaan jakaa kahteen ryhmään niiden hapensieto-ominaisuuden perusteella. Anaerobiset mikrobit elävät hapettomissa oloissa ja käyttävät energia-aineenvaihdunnassa epäorgaanisia yhdisteitä, kuten nitraatteja ja sulfaatteja elektroninsiirtoketjussa hapen sijasta. Fakultatiiviset anaerobit käyttävät anaerobisille mikrobeille ominaisesti epäorgaanisia yhdisteitä hyödyksi energia-aineenvaihdunnassaan, mutta sietävät hapen läsnäoloa ja mahdollisesti pystyvät käyttämään happea elektroninsiirtoketjussa. Aerobiset mikrobit käyttävät yksinomaan happea elektroninsiirtoketjussa, eivätkä ne näin ollen selviydy hapettomissa olosuhteissa. Polttoainejärjestelmissä esiintyvät sulfaatinpelkistäjäbakteerit (SRB, *Sulphate Reducing Bacteria*) ovat pääasiassa ehdottomia anaerobeja, jotka viihtyvät pääosin polttoainesäiliöiden pohjassa. [7.] Esimerkiksi säiliöiden pintojen korroosion on todettu aiheutuvan juuri SRB:iden aineenvaihdunnan seurauksena.

Keskitisleet toimivat erityisen hyvin mikrobien ravinnonlähteenä, sillä suurin osa heterotrofeista eli toisenväraisistä mikrobeista pystyvät hyödyntämään keskitisleiden hiilivetyjä energia-aineenvaihdunnassaan hiilivetyketjujen koon ansiosta. Lentopetrolin (C10-C16) sisältämiä hiilivetyjä hyödyntäviä mikrobeja on vähemmän kuin mineraalidieselin

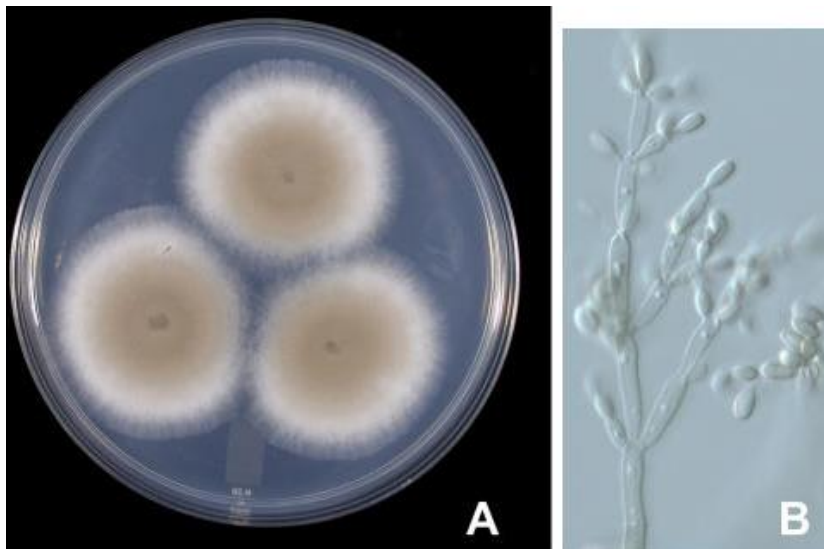
(C15-C22), jolloin dieselpolttoaineissa esiintyy verrattain suurempi määrä eri mikrobilajeja. Bensiinin hiilivetyketjut (C5-C12) voivat vaurioittaa mikrobien solukalvorakenteita, jolloin bensiini toimii osaksi toksiinina mikro-organismeille. [6.]

### 2.2.2 *Hormoconis resinae* -mikrobi

Selkeästi yleisimmin esiintyvä mikrobi polttoainejärjestelmissä on kotelosieniin (*Ascomycota*) kuuluvan *Amorphotheca resinae* anamorfinen muoto *Hormoconis resinae*, joka syntyy suvuttoman itiöinnin kautta. *Hormoconis resinae* tunnetaan myös nimellä *Cladosporium resinae* sekä *Cladosporium avellaneum*. [8.]

*Hormoconis resinae* osuus mikrobikontaminaatioissa on merkittävä. On arvioitu, että 70 % dieselpolttoaineiden ja 95 % lentopetrolin kontaminaatiotapauksissa *Hormoconis resinae* on läsnä [5]. *H.resinae* merkittävä esiintyvyys selittyy muun muassa mikrobilajityypillisillä ominaisuuksilla, kuten hyvällä kylmänsietokyvyllä, joka edesauttaa esimerkiksi lentopetrolissa selviytymisessä. Myös lentopetrolin hiilivetyjen hyödyntäminen metaboliassa sekä vähäinen kilpailu elinympäristöstä selittää mikrobilajin esiintyvyyttä lentopetrolissa. Dieselpolttoaineen hiilivetyketjuja ravinnonlähteenä pystyvät hyödyntämään selvästi useampi mikrobilaji. [9.]

Kuvassa 3 on esitetty *Amorphotheca resinae* -mikrobilajin pesäkkeitä (A) ja mikroskooppikuva *Hormoconis resinae* homeitiöryhmästä (B). *Hormoconis resinae* on todettu aiheuttavan polttoainejärjestelmän putkistojen tukkeutumisia sekä metalliosien korroosiota. Homeen tunnistamiseen on kehitetty useita fysiologisia ja biokemiallisia testejä, joita käytetään muun muassa lentokoneiden polttoainesäiliöiden monitoroinnissa. [8.]



Kuva 3. A) *Amorphotheca resinae* -pesäkkeitä. B) Mikroskooppikuva *Hormoconis resinae* itiörihmastosta [10].

### 2.2.3 Kontaminaation aiheuttamat tuote- ja turvallisuusriskit

Mikrobikontaminaatio polttoaineessa voi aiheuttaa lukuisia ongelmia polttoainejärjestelmissä ja -säiliöissä. Taulukossa 1 on esitetty polttoainejärjestelmään kohdistuvia haittoja sekä haittoja aiheuttavat mikrobityypit.

Taulukko 1. Polttoainejärjestelmään kohdistuvat haitat [6].

Polttoainejärjestelmän ongelmat	Mikrobityyppi
Tukkeutumat (putket, venttiilit, suodattimet)	Sienet
Säiliöiden ja putkistojen korroosio	Sienet ja anaerobiset bakteerit
Säiliöiden pintojen kuluminen	Sienet
Suuttimien likaantuminen	Sienet ja aerobiset bakteerit
Moottoriosien käyttöiän lyhentäminen	Ei määritetty

Polttoainesäiliöissä ja putkistoissa esiintyvä mikrobien aiheuttama korroosio (MIC, *Microbiologically induced corrosion*) voi olla voimakasta. Suurin osa korroosiotapauksista liitetään sulfaatinpelkistäjäbakteereihin (SRB).

Polttoainejärjestelmään kohdistuvien ongelmien lisäksi merkittävä mikrobien aiheuttama kontaminaatio vaikuttaa polttoaineen koostumukseen, jolloin polttoaineen laadulliset ominaisuudet heikentyvät. Polttoaineeseen kohdistuvia haittoja sekä haittojen aiheuttamia mikrobityyppejä on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Polttoaineeseen kohdistuvat haitat [6].

<b>Polttoaineen laadulliset ongelmat</b>	<b>Mikrobityyppi</b>
Hiilivetyjen pilkkoutuminen	Sienet ja aerobiset bakteerit
Vesipitoisuuden kasvu	Kaikki
Rikkipitoisuuden kasvu	SRB
Liejun muodostuminen	Kaikki
Kiinteiden partikkeleiden muodostuminen	Kaikki

Kontaminaation aiheuttamien polttoaineeseen ja polttoainejärjestelmään kohdistuvien riskien lisäksi yksi merkittävä riski on terveydellinen [2]. Endotoksiineja tuottavat bakteerit, SRB:t ja opportunistiset patogeenit, ovat terveysuhka esimerkiksi säiliön puhdistuksen yhteydessä. Rikkipitoisuuden kasvuun liittyy rikkivedyn määrän lisääntyminen. Rikkivety on erittäin myrkyllinen ja ympäristölle vaarallinen kaasu [11].

#### 2.2.4 Biosidit

Biosidi on yleisnimitys kemiallisille yhdisteille ja valmisteille, joiden tarkoituksena on eliöiden torjunta tuhoamalla eliöt tai estää niiden kasvumahdollisuudet. Biosidit luokitellaan niiden käyttötarkoituksen mukaan säilytysaineisiin, desinfiointiaineisiin, tuholaistorjunta-aineisiin ja muihin biosidivalmisteisiin, kuten antifouling-valmisteisiin. [12.]

Polttoaineissa käytettävät biosidit voidaan jakaa kolmeen ryhmään niiden liukoisuuden perusteella. Öljyliukoisia biosideja voidaan käyttää polttoaineen mukana polttoainejärjestelmissä, jolloin mikrobitorjunta ulottuu polttoaineen lisäksi polttoainejärjestelmien rakenteisiin, kuten suodattimiin ja venttiileihin. Polttoaineeseen liukenevat biosidit eivät pääse vaikuttamaan vesifaasissa, jossa mikrobitasot ovat yleisesti korkeita suhteessa polttoaineeseen. Vesiliukoisia biosideja käytetään yleensä lyhytkestoisesti polttoaineen vesifaasissa sekä säiliöiden pohjalla olevia mikrobeja vastaan.

Yleisesti liukoiset biosidit ovat pääasiassa öljyliukoisia, mutta on myös riittävä liukoisuus veteen. Yleisesti liukoissa biosideissa yhdistyvät sekä vesi- että polttoainefaaseissa käytettävien biosidien hyödyt, jolloin ne vaikuttavat kokonaisvaltaisesti polttoaineeseen ja polttoainejärjestelmiin. Yleisesti liukenevat biosidit ovat kalliimpia suhteessa yhteen faasiin liukeneviin biosideihin. [13.]

Biosidien vaikutustapa mikrobien torjuntaan ja eliminointiin vaihtelee. Vaikutusmekanismeja ovat mikrobin solukalvon tai soluseinän mekaaninen hajottaminen, solukalvon tai seinän toimintaan vaikuttaminen esimerkiksi ravintoaineiden ja metaboliatuotteiden kulkeutumisen estämisellä. Biosidit voivat myös vaikuttaa itse metaboliatoimintoihin, jolloin mikrobin solujakautuminen estyy. [14.]

Biosidien käyttöön liittyy runsaasti rajoituksia ja kieltoja etenkin lentopetrolin suhteen, eikä biosideja tyypillisesti käytetä ennaltaehkäisevässä tarkoituksessa. Biosidien käytössä tulee huomioida käyttöön liittyvät määräykset, kuten biosideja sisältävän polttoaineen laatutason alentamisperusteet sekä jätteenkäsittelyyn liittyvät seikat. Lentopolttoaineille löytyy kaksi hyväksyttyä biosidistä lisäainetta (Biobor JF, Kathon FP 1.5), joihin liittyy runsaasti rajoituksia muun muassa lakien ja valmistajan suunnalta.

Mikrobikasvuston tuhoamiseen esimerkiksi polttoainesäiliössä suositellaan ensisijaisesti höyrypuhdistusta tai kuumavesipesua. Säiliöiden puhdistaminen voidaan suorittaa neljällä eri menetelmällä: höyry-, kuumavesi-, hypokloriittipesulla tai hiilivetyhuuhtelulla.

Lentopolttoaineiden polttoainesäiliöissä biosidien käyttöä mikrobikasvuston tuhoamiseen pyritään välttämään, sillä polttoaine tulisi biosidille altistumisen jälkeen alentaa lentopolttoaineena kelpaamattomaksi. [15.]

### 2.3 Mikrobimääritysmenetelmät

Mikrobiologiset määritykset ja testit eroavat huomattavasti kemiallisista ja fysikaalisista määrityksistä. Mikrobiologisissa määrityksissä lukuisat ominaisuudet vaikuttavat määrittystuloksiin ja erityisesti tulosten oikeellisuuteen. Välittömästi näytteenoton jälkeen näytteen kokonaismikrobipitoisuus kokee vaihtelua: mikrobit lisääntyvät, kuolevat ja ovat metabolisesti aktiivisia. Esimerkiksi polttoainesäiliön pohjasta otetussa näytteessä voi esiintyä hapettomassa ympäristössä viihtyviä anaerobisia bakteereja (SRB:t), jotka kuitenkin eivät selviä näytteenotosta johtuvasta stressitilanteesta, jossa mikrobit päätyvät hapellisiin olosuhteisiin. Näin ollen näytteen elinkykyisten mikrobien määrä laskee, jolloin näyte ei enää edusta säiliön mikrobipitoisuutta ja -diversiteettiä.

Mikrobien havaittavuuteen vaikuttavat mikrobien lajityypilliset ominaisuudet, kuten esimerkiksi edellä mainittu anaerobisten bakteerien hapensietokyky sekä fysiologinen tila. Mikro-organismien fysiologisella tilalla tarkoitetaan esimerkiksi sitä, minkä tyypisessä vaiheessa mikrobisolun solujakautuminen on näytteenottohetkellä. Tämä vaikuttaa solun selviytymiseen olosuhteenmuutoksesta, jolloin eri vaiheessa olevat solut voivat reagoida eri tavalla muutokseen. Myös mikrobien tuottamat itiöt voivat vaikuttaa mikrobimääritysten tuloksiin.

Kemiallisissa ja fysikaalisissa määrityksissä näytteet mielletään homogeenisiksi. Kuitenkin mikrobit esiintyvät tyypillisesti polttoainematriisissa ryppäinä, jolloin solut eivät ole jakautuneet tasaisesti näytteessä. Näytteen heterogeenisyys mikrobien suhteen lisää mittausvirhettä. [16.]

### 2.3.1 MicrobMonitor<sup>2</sup> (IP 613/14)

MicrobMonitor<sup>2</sup> (ECHA Microbiology Ltd.) on polttoaineiden mikrobipitoisuusmäärittämiseen tarkoitettu testimenetelmä, joka on yhtäläinen Energy Institute -järjestön julkaiseman IP613/14-menetelmän kanssa [17]. Menetelmä on suunnattu käytettäväksi lento-polttoaineiden ja dieselöljyn öljy- ja vesifaasin mikrobipitoisuuksien määrittämiseen.

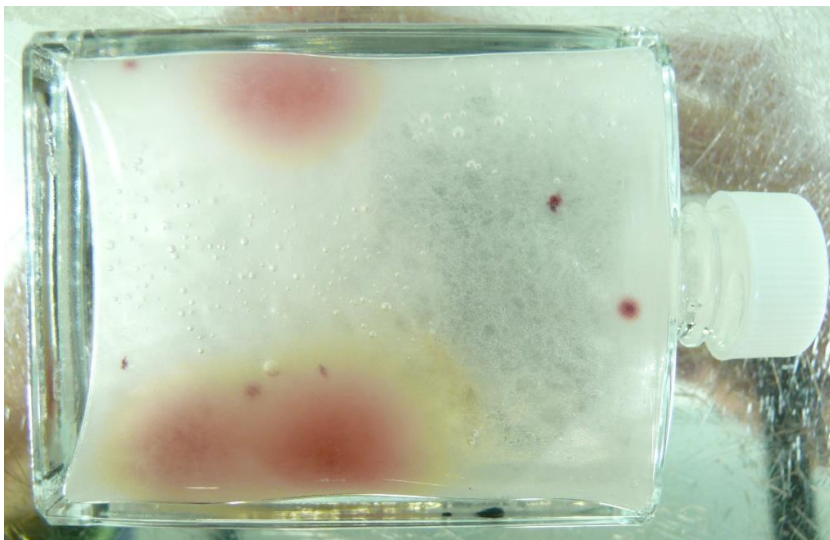


Kuva 4. MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmässä käytetty geelipullo, johon siirrostetaan tunnettu näytemäärä näytettä.

Testi perustuu mikrobien kasvattamiseen inkubaattorissa 25 °C lämpötilassa neljän vuorokauden ajan. Kasvatusalustana toimii lasipullossa oleva tiksotrooppinen geeli, joka sisältää ravinteita sekä mikrobien havaitsemiseen mahdollistavaa väri-indikaattoria. Tiksotropia eli lepojähmeys on eräillä materiaaleilla esiintyvä ominaisuus, jossa energiaa siirrettäessä materiaaliin esimerkiksi sekoittamalla, materiaalin viskositeetti vähenee. Sekoituksen loputtua aine palaa alkuperäiseen, jähmeään muotoon. Tyypillisiä tiksotrooppisia nesteitä ovat muun muassa maalit ja hunajat. [18, 19.]

Mikrobikasvusto kasvatusalustassa havaitaan geelin sisältämän väri-indikaattorin avulla. Bakteerit ja hiivat havaitaan pistemäisinä pesäkkeinä, kun taas homesienet havaitaan laajalle levinneinä pesäkkeinä. Homeiden rihmastollinen kasvu aiheuttaa kasvuston leviämisen geelillä. Kuvassa 5 on esimerkki väri-indikaattorin avulla havaittavista pesäkkeistä, jotka lasketaan mikrobipitoisuuden määrittämiseksi.





Kuva 5. Väri-indikaattorin avulla havaitut pesäkkeet MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmän kasvatusalustalla. Laajalle levinneet pesäkkeet ovat homeita, pistemäiset pesäkkeet bakteereita ja hiivasieniä.

Menetelmässä tunnettu näytemäärä siirrostetaan geelipulloon steriilillä ruiskulla tai siirrostussilmukalla. Lentopetroleille suositellaan näytemäärää 0,5 ml, muille keskitisleille 0,25 ml. Näytemäärä vaikuttaa menetelmän tarkkuuteen. Pullon sisältämä geeli rikotaan ravistelemalla voimakkaasti 30 sekunnin ajan, minkä jälkeen pullo asetetaan lämpökaappiin vaakatasossa neljäksi vuorokaudeksi. Inkubaatioajan jälkeen pesäkkeet lasketaan ja määritetään näytteen kokonaismikrobipitoisuus seuraavalla laskentakaavalla.

$$\text{cfu/l} = \frac{\text{pesäkelukumäärä} * 1000}{\text{näytemäärä (ml)}}.$$

### 2.3.2 IP 385/99

IP385–standardimenetelmä on MFT-tekniikkaan (*membrane filter technique*, kalvosuodatustekniikka) perustuva maljakasvatusmenetelmä, jossa tunnettu näytemäärä polttoainetta suodatetaan steriilien membraanisuotimien (0,45 µm) läpi. Kalvosuotimet pestään näytteen suodatuksen jälkeen kaupallisella Tween80-pesuliuoksella (10 ml) ja huuhdellaan suolaliuoksella (3 x 10 ml). Suotimet asetetaan kahdelle kasvatusmaljalle, inkuboidaan 5 vuorokautta 25 °C lämpötilassa.

Kasvatusalustoina käytetään hiivoille ja homeille selektiivistä mallasuuteagaria (MEA, *malt extract agar*), kun taas bakteereiden kasvatukseen käytetään tryptoni-soija-agaria

(TSA, *tryptone soy agar*). MEA suosii hiivojen ja homeiden kasvua muun muassa kasvatusalustan pH:n ( $5,4 \pm 0,2$ ) ansiosta. TSA ( $\text{pH } 7,3 \pm 0,3$ ) ei ole niinkään selektiivinen alusta, joten myös muut kuin bakteerit voivat kasvatusalustalla kasvaa. Kuitenkin alustan pH antaa kasvumahdollisuusetua bakteereille, jolloin inkubaatioajan puitteissa TSA toimii juuri bakteerien määrittämiseen. [20.]

Pesäkemäärät lasketaan kolmen ja viiden vuorokauden jälkeen inkubaation aloittamisesta. Pesäkelaskuissa eritellään mikro-organismit erikseen bakteereihin, hiivoihin ja homeisiin. Osa mikrobeista voi kasvaa molemmilla kasvualustoilla. Tällöin lasketaan molemmilta kasvualustoilta mikrobilajin pesäkkeet ja käytetään tulosten laskennassa korkeampaa laskettua pesäkemäärää. Tulos ilmoitetaan yksikössä cfu/l eli pesäkettä muodostavaa yksikköä litraa kohden. Tulos lasketaan seuraavan yhtälön mukaisesti.

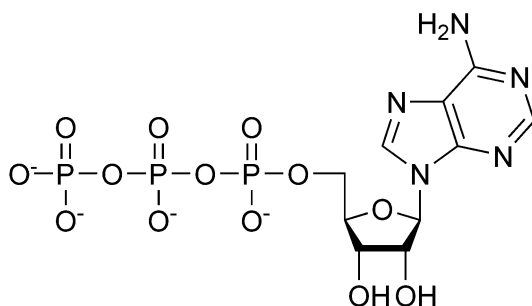
$$\text{cfu/l} = \frac{\text{pesäkelukumäärä} * 1000}{\text{näytemäärä (ml)}}.$$

### 2.3.3 HY-LITE®

HY-LITE-menetelmä toimii pikatestinä, jossa mitataan näytteen sisältämää mikrobiperäistä adenosinitrifosfaattipitoisuutta (ATP). Kuten useimmille pikamenetelmille, myös HY-LITE-testille on ominaista helppous ja nopeus, mutta samalla määrittämisen kvantitatiivisuuden puute. Määrittämenetelmässä mitataan ATP:n avulla valosäteilyä, joka ilmoitetaan suhteellisenä valoyksikkönä (*relative light unit*, RLU).

Menetelmä perustuu näytteen sisältämien mikrobien havaitsemiseen bioluminesenssi-reaktion avulla. Bioluminesenssilla tarkoitetaan kemiallista reaktiosarjaa, jossa soluorganismien tuottama ja sisältämä kemiallinen energia muuttuu säteilyenergiaksi.

Adenosinitrifosfaatti eli ATP on elintärkeä yhdiste eliöille. ATP koostuu adeniinista (emäsosa), riboosista (sokeriosa) sekä kolmesta fosfaatista (kuva 6). ATP-molekyylin fosfaattien sidokset sisältävät runsaasti kemiallista energiaa, jota solut käyttävät energiansiirtoon ja väliaikaisesti varastointiin. [21.]



Kuva 6. Adenosiinitrifosfaatin (ATP) rakennekaava [22].

Solujen sisältämää ATP:tä käytetään energialähteenä bioluminesenssireaktiossa, jossa saadaan aikaan näytteen sisältämien mikrobien ATP:n, lusiferaasientsyymin sekä lusiferiinin avulla säteilyä. Lusiferaasi on yleisnimitys bioluminesenssireaktiossa käytettävästä hapettavasta entsyymistä. Lusiferiinilla tarkoitetaan yhdistettä, joka hapettuuessaan siirtyy virittyneeseen tilaan. Virittyneen tilan purkautuessa molekyyli emittoi valoa, jonka määrää mitataan luminometrillä (kuva 7).



Kuva 7. HY-LITE®-testimenetelmässä käytettävä näytepullo (1 l), reagenssikynä ja luminometri.

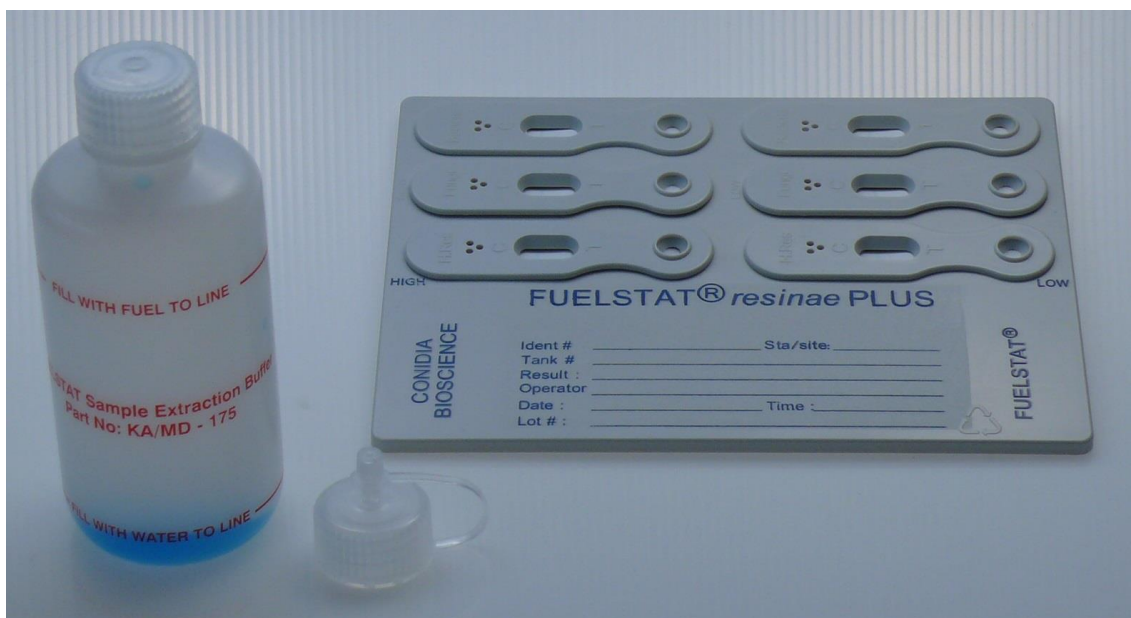
Luminometrin toiminta perustuu signaalin eli valokvantin monistamiseen, jolloin laitteella voidaan mitata verrattain pieniä valomääriä. Luminometri antaa arvoja suhteellisina valoyksiköinä (RLU). RLU-arvot eivät ole verrattavissa suoraan esimerkiksi mikrobipesäkemääritysten CFU-arvoihin, mutta arvojen perusteella voidaan kuitenkin päätellä näytteen mikrobitaso ATP-pitoisuuden avulla. Menetelmäohjeen mukaan 1 RLU vastaa noin  $5 \times 10^{-15}$  grammaa ATP:tä.

Määrittystuloksiin vaikuttavat näytteen sisältämät lisä-aineet, kuten esimerkiksi polttoaineissa käytettävä jäätymisenestoaine (FSII, *Fuel system icing inhibitor*), jota käytetään estämään jään muodostumista polttoaineessa kylmissä olosuhteissa. FSII häiritsee bioluminesenssireaktiota, jolloin mitattu tulos on todellista arvoa pienempi. [23.]

### 2.3.4 Fuelstat® Resinae+

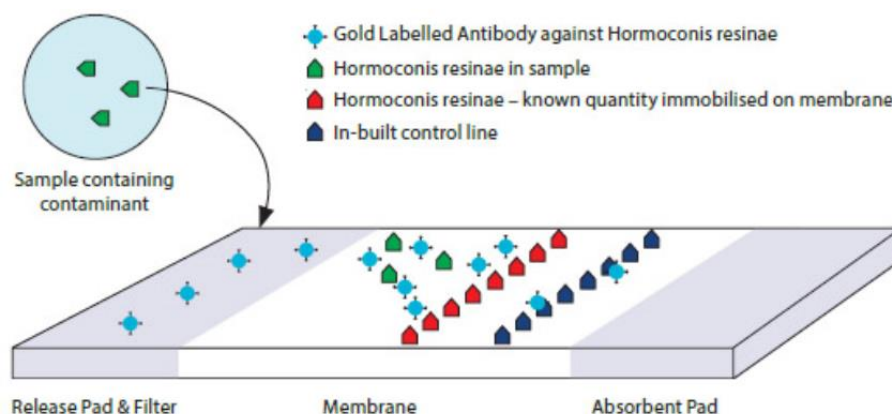
Fuelstat® Resinae+ (Conidia Bioscience Ltd.) on immunologinen pikatestimenetelmä, joka perustuu mikrobisolujen pintarakenteiden tunnistamiseen antigeeni-vasta-aine-reaktioon. Määritysmenetelmä sisältää samanaikaisesti spesifisen testin bakteereille, sienille sekä *Hormoconis resinae* -mikrobille.

Kuvassa 8 on esitetty menetelmässä käytettävä testiliuska-alusta, joka sisältää kuusi eri testiliuskaa (kolme low level -testiä ja kolme high level -testiä) sekä näytepullo, josta siirretään näytettä testiliuskoille. Näytettä (160 ml) ravistellaan reagenssipullossa, minkä jälkeen reagenssiluosta annostellaan testiliuskoille (kuva 8). Tämän jälkeen annetaan näytteen siirtyä liuskan vastakkaisella puolella olevaan imutyynyyn (10 min). Tulosten tulkinta suoritetaan testiliuskojen testi- ja kontrolliviivojen perusteella.



Kuva 8. Fuelstat Resinae+ -menetelmässä käytettävä testiliuska-alusta ja reagenssipullo.

Lähtöalusta sisältää spesifisiä vasta-aineita, jotka kiinnittyvät näytteen sisältämiin mikrobien solun pintarakenteisiin. Ylimääräiset, kiinnittymättömät vasta-aineet kiinnittyvät testiviivan spesifiseen antigeeniin, jolloin testiviiva värjäytyy (kuva 9). Mikäli tietty raja-arvo ylittyy antigeenien määrässä, ei vasta-aineita ole tarpeeksi sitoutumaan testiviivaan, jolloin testiviivaa ei havaita ja tulos on testiliuskan osalta positiivinen.



Kuva 9. Menetelmän toimintaperiaate. Näytteen sisältämät mikrobin pintarakenteet (kuvassa vihreät partikkelit) sitoutuvat testiliuskan lähtöalustan spesifisiin vasta-aineisiin (siniset partikkelit) ja kulkeutuvat pitkin testiliuskaa kohti imutyynyä. Testiliuskan testiviivaan (punainen) kiinnittyvät ylimääräiset eli vapaat vasta-aineet (sininen), jolloin testiviiva havaitaan punertavana viivana. Mikäli näyte sisältää runsaasti mikrobeja, kiinnittyvät kaikki lähtöalustan vasta-aineet mikrobin pintarakenteisiin. Tällöin vasta-aineita ei riitä kiinnittymään testiviivaan, eikä testiviivaa näin ollen havaita. [5.]

Menetelmä perustuu näytteen kulkeutumiseen testiliuskalla, jossa on kiinnitettynä kaksi merkkiviivaa (testi- ja kontrolliviiva). Testiviivan avulla havaitaan näytteen sisältämä mikrobipitoisuustaso. Kontrolliviivan tarkoituksena on varmistaa, että näyte liikkuu testiliuskalla imutyynyä kohti. Mikäli kontrolliviivaa ei havaita, on testi hylättävä. Syynä useimmiten kontrolliviivan puuttumiseen ja testin hylkäämiseen on näytteen liikkumisen estävä kiinteä partikkeli testiliuskalla tai annostelukuopassa. Testiliuskojen tuloksia tulkitaan yhdessä. Jos koko testiliuskasarjassa havaitaan yksi low level -testin positiivinen tulos on koko näytteen tulos heikko positiivinen ( $> 4000$  cfu/l). Mikäli vähintään kaksi low level -testin testiviivaa tai vähintään yksi high level -testin testiviiva puuttuu, on tulos raskas positiivinen ( $> 20\,000$  cfu/l). Menetelmässä ei saada tarkkoja numeerisia tuloksia vaan mikrobikontaminaatiotasoja, joiden mukaan päätellään mikrobikontaminaation vakavuus. [5.]

### 3 Menetelmien vertailu

Mikrobimääritysmenetelmien vertailua suoritettiin sekä polttoainenäytteistä saatujen tulosten perusteella että pohtimalla määritysten soveltuvuutta tarkoitukseensa. Tulosten avulla tutkittiin muun muassa menetelmien luotettavuutta ja herkkyyttä. Määritysten suoritussvaiheessa vertailtiin käytettävyyttä, määritykseen kuluvaan aikaan sekä kokonaisuutta käyttötarkoitusta ajatellen.

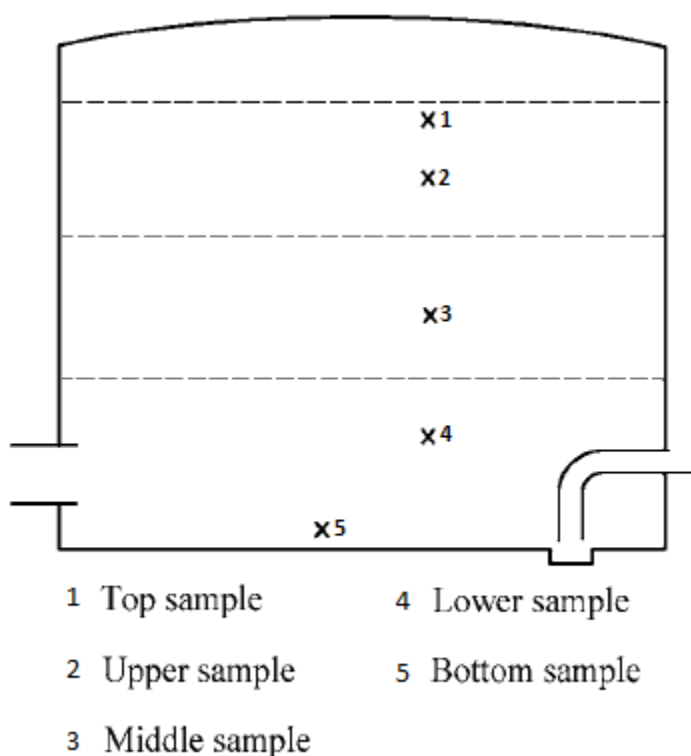
#### 3.1 Työn suoritus

##### 3.1.1 Näytteenotto ja esikäsittelytoimenpiteet

Vertailtaviin mikrobimääritysmenetelmiin sovellettiin yhteistä näytteenottomenettelyä [24], jolla pyrittiin saamaan näytteistä mahdollisimman vertailukelpoisia keskenään. Näytteenotossa käytetyt tarvikkeet steriloidtiin asianmukaisesti autoklaavissa (121 °C, 20 min), lämpökaapissa (175 °C, 60 min) tai alkoholikäsittelyllä (70 til- % etanoliliuos). Aseptiseen työskentelyyn kiinnitettiin erityistä huomiota, sillä polttoainesäiliöitä ja -järjestelmiä ei ole suunniteltu mikrobiologisten määritysten näytteenotoille.

Kaksi määritysmenetelmää sisälsi neljän ja viiden vuorokauden inkubaatioajan, joten näytteenotot suoritettiin suunnitellusti torstaina ja perjantaina. Tällöin näytteiden inkubaatio osui viikonlopulle, ja tulosten tulkitseminen oli mahdollista seuraavan viikon alussa. Näytteenottopäivänä selvitettiin säiliöiden sen hetkiset tilat säiliöalueen vastuuhenkilöltä. Säiliöiden tilojen selvittämisellä varmistettiin näytteeksi soveltuvat säiliöt. Näytteiden näytteenotto pyrittiin suorittamaan polttoainesäiliön ollessa passiivisessa tilassa eli tilassa, jossa säiliöön liittyviä polttoainesiirtoja ei ole tehty hetkeen. Vesitysnäytteet pyrittiin ottamaan tilanteessa, jossa säiliön vesityksestä oli kulunut mahdollisimman pitkä aika.

Säiliöissä on säiliöstä riippuen 3-5 neulaventtiilillä toimivaa näytteenottopistettä säiliön sivussa sekä vesityshana säiliön pohjassa (kuva 10).



Kuva 10. Polttoainesäiliön näytteenotossa käytettävien näytteenottohanojen sijainti [25].

Näytteenotossa kiinnitettiin erityistä huomiota suorituksen aseptisuuteen, sillä polttoainesäiliöiden näytteenottohanat eivät ole suunniteltu mikrobiologisten määritysten näytteenottoon. Myös ulkoilmassa suoritettu näytteenotto vaikeutti näytteenoton aseptisuutta.

Polttoainesäiliön venttiilihana pyyhittiin 70 til-%:n etanoliliuoksella, minkä jälkeen polttoainetta laskettiin säiliön keräysputkeen. Tämä siksi, että itse näyte haluttiin säiliön sisältä eikä ulostuloputkesta. Näytettä (3 litraa) kerättiin kolmeen litran vetoiseen steriiliin lasipulloon, minkä jälkeen näyte-erät yhdistettiin yhteen viiden litran säilytyspulloon. Näytteille suoritettiin näytteenoton jälkeinen visuaalinen tarkastelu, jossa tarkasteltiin näytteen ulkonäköä lian ja normaalista poikkeavan värin varalta. Näytteen annettiin tasaantua tunnin verran, minkä jälkeen tarkasteltiin hydrofobisen ja hydrofiilisen faasin erottumista. Mikäli hydrofiilistä eli vesifaasia ei ollut, sekoitettiin näytettä, minkä jälkeen näyte analysoitiin. Virheellisissä olosuhteissa mikrobi voi tuhoutua tai lisääntyä, jolloin tutkimustulos ei vastaa mikrobikasvuston alkuperäistä määrää. Analyysit suoritettiin viimeistään neljä tuntia näytteenoton jälkeen.

Kasvatusmenetelmien (IP385, MicrobMonitor<sup>2</sup>) määritykset suoritettiin ensimmäisinä. IP385-menetelmän määritys tehtiin standardin ohjeiden mukaisesti. Näytteenä käytettiin



40 ml:n näytemäärää yhtä suodinta kohden, jolloin kokonaisnäytemäärä oli 80 ml. MicrobMonitor2-menetelmä suoritettiin menetelmäohjeen mukaisesti, kuitenkin käyttäen 0,5 ml:n näytemäärää näytteen tyypistä (Jet A-1, diesel) riippumatta. Pikatestimenetelmä HY-LITE:n määrittäminen suoritettiin ASTM-standardin D7463-ohjeiden mukaisesti, mikä on yhtäläinen määrittämisessä käytettävän laitteen ohjeen kanssa. Määrittäminen suoritettiin yhden litran näytetilavuudella, jolloin mitattu tulos saatiin suoraan yksikössä rlu/l (*relative light unit per litre*). Fuelstat Resinae+ -menetelmän määrittäminen suoritettiin testin mukana tulleen ohjeen mukaisesti.

### 3.1.2 Kontaminaationäyte vertailumateriaalina

Työn edetessä huomattiin polttoainenäytteiden sisältävän varsin vähäisiä määriä mikrobikasvustoa, jolloin etenkin pikatestimenetelmillä saatiin niin sanottuja nollatuloksia huomattavan paljon. Menetelmien työn suorituksen vaiheet pohdittiin tarkasti läpi mahdollisten virhelähteiden löytämiseksi. Myös HY-LITE-menetelmässä käytetyn luminometrin toimintakuntoa epäiltiin. Tästä syystä suunniteltiin kontaminaationäyte, jolla ensinnäkin varmistettiin menetelmien toimintakunto, mutta samalla kerättiin tulodataa vertailua varten. Litraan polttoainetta siirrostettiin TSA-agarilla kasvatettua mikrobimassaa, joka oli peräisin polttoainenäytteestä. Tällä varmistettiin se, että kontaminaationäytteen sisältämät mikrobit pysyvät metabolisesti aktiivisina polttoainematriisissa. Tämän jälkeen näyte analysoitiin määrittämis menetelmillä normaalisti.

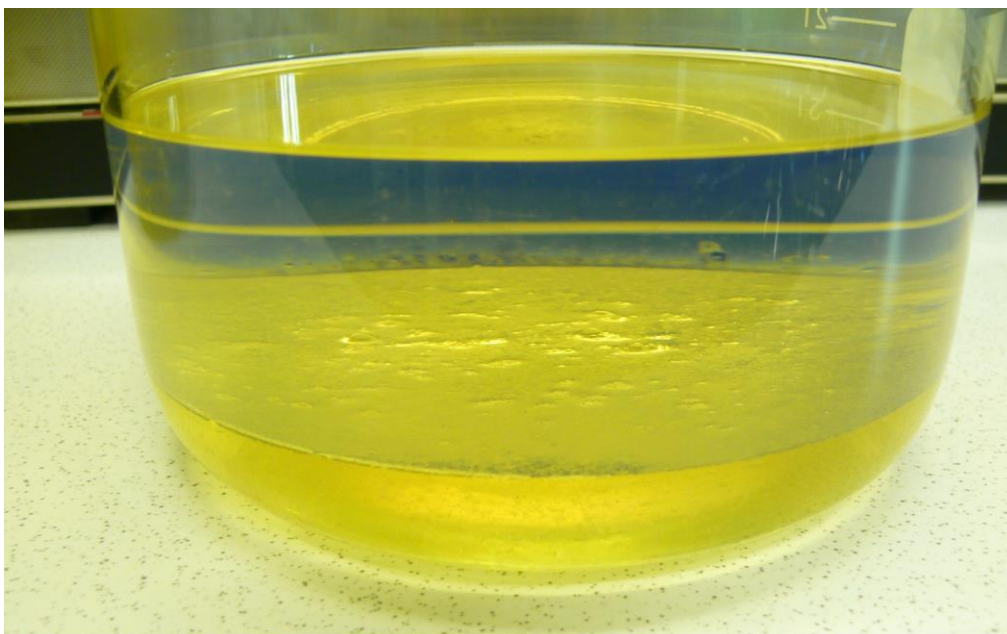
Kontaminaationäytteestä saatiin määritettyä kasvatusmenetelmillä (IP385, MicrobMonitor<sup>2</sup>) erittäin suuret mikrobipitoisuudet. Myös HY-LITE-testi antoi nollatasosta poikkeavan tuloksen, jolloin esimerkiksi luminometri todettiin toimintakuntoiseksi. Fuelstat Resinae+ -testin tuloksen tulkinta jäi tulkinnanvaraiseksi menetelmässä tulkittavien testi-luskojen testiviivojen takia.

### 3.1.3 Säilytysnäytteet

Säilytysnäytteiden tarkoituksena oli nostaa näytteiden mikrobipitoisuuksia ja samalla tutkia veden ja FAME:n vaikutusta mikrobipitoisuuksiin. Näytteitä säilytettiin yksi kuukausi valolta suojattuna (kuva 11). Näytteitä ravisteltiin kahdesti säilytysjakson aikana. Säilytysnäytteissä havaittiin selkeitä visuaalisia eroja normaaleihin näytteisiin. Muun muassa polttoaine faasin väri ja kirkkaus muuttuivat huomattavasti osassa säilytysnäytteistä. Säilytysnäytteissä, joihin oli lisätty vettä, havaittiin polttoaine- ja vesifaasin rajapinnassa selkeää vaahtomaisen näköistä mikrobikasvustoa (kuva 12).



Kuva 11. Säilytysnäytteet suojattiin valolta foliolla. Näytteitä ravisteltiin kahdesti säilytyksen aikana.



Kuva 12. Näytteen 1.18.2 faasien rajapinta, jossa havaittiin selkeää mikrobikasvuston aikaansaama vaahtomainen rajapinta.

## 3.2 Tulokset

Määrittämiä suoritettiin yhteensä 46 näytteestä, jotka koostuivat yksittäis-, rinnakkais- sekä säilytysnäytteistä. Lisäksi suoritettiin määrittämykset suunnitellusta kontaminaationäytteestä. Jokaisesta näytteestä tehtiin yksi määrittämykset jokaisella työssä vertailtavalla testimenetelmällä. Vertailtavien määrittämyksien lisäksi kahdeksan näytettä analysoitiin lentopetroleille suunnatulla Resinae Jet -testikitillä, jolla määritetään spesifisesti polttoaineen *Hormoconis resinae* -mikrobin pitoisuutta. Määrittämyksistä kertyi yhteensä 196.

### 3.2.1 Määrittämyksien tulokset

HY-LITE -pikatestimenetelmän nollataso määritettiin kahdesti työn edetessä. Nollatason mittaukseen otettiin ensimmäisellä määrittämyksellä 18 rlu/l ja toisella 27 rlu/l. Maljakasvatusmenetelmässä (IP 385) valmistettiin jokaisella määrittämyksellä negatiiviset kontrollimaljakasvatukset, millä varmistettiin valmistettujen pesu- ja suolaliuosten sekä käytettyjen mittalasioiden olevan steriilejä. Määrittämyksien jokainen negatiivinen kontrollinäyte antoi negatiivisen tuloksen 0 cfu/l.

Yksittäisnäytteiden näytteenotto suoritettiin pääasiassa polttoainesäiliön alimmasta näyttehanasta lukuun ottamatta näytteitä 1.1, 1.2 ja 1.3, joiden näytteenotossa käytettiin säiliöiden alemmaa keskihanaa. Näytteitä otettiin kahdesti polttoainesäiliön neljästä eri näytteenottokohdasta, jolloin menetelmävertailun ohella tutkittiin polttoainesäiliön mikrobipitoisuuksia säiliön eri korkeuksilla.

Säilytysnäytteiden avulla pyrittiin nostamaan polttoainenäytteen mikrobipitoisuutta, jolloin määrittämyksistä saatiin nollatason ylittäviä tuloksia vertailtaviksi. Samalla tutkittiin veden ja FAME:n läsnäolon vaikutuksia mikrobitasoihin. Referenssinäytteinä säilytysnäytteille toimi samana päivänä samasta säiliöstä otettu yksittäisnäyte, joka analysoitiin näytteenottopäivänä. Taulukossa 3 on esitetty näytteiden tulokset kullakin mikrobimäärittämyksellä.

Taulukko 3. Mikrobimääritysmenetelmillä saadut näytetulokset.

Näyte	HY-LITE (rlu/l)	Fuelstat Resinae+	IP385 (cfu/l)	MicrobMonitor <sup>2</sup> (cfu/l)
1.1	12	neg.	0	0
1.2	12	neg.	0	0
1.3	18	neg.	0	0
1.4	16	neg.	0	0
1.5	18	neg.	0	0
1.6	14	neg.	50	0
1.7	34	neg.	25	0
1.8	16	neg.	0	0
1.9	20	neg.	0	0
1.10	15	neg.	0	0
1.11	15	neg.	475	0
1.12	17	neg.	4425	4000
1.13	23	neg.	75	0
1.14	24	neg.	4375	2000
1.15	17	neg.	3350	0
1.16	19	neg.	75	0
1.17	70	neg.	25	0
1.18	18	neg.	225	0
1.19	18	neg.	475	10000
1.20	24	neg.	750	0
1.21	110	neg.	6000	14000
1.22	140	neg.	14275	34000
2.1	19	neg.	500	0
2.2	21	neg.	400	0
2.3	17	neg.	400	0
2.4	2700	high.	22400	1,6*10 <sup>7</sup>
3.1	16	neg.	50	0
3.2	17	neg.	50	0
3.3	18	neg.	0	0
3.4	200	neg.	75	0
4.1.1	31	neg.	0	0
4.1.2	61	neg.	0	0
4.2.1	15	neg.	25	0
4.2.2	18	neg.	50	0
5.1.1	17	neg.	25	0
5.1.2	14	neg.	25	0
5.1.3	14	neg.	0	0
5.1.4	110	neg.	0	0
1.3	18	neg.	0	0
1.3.1	15	neg.	0	0
1.3.2	14	neg.	0	0
1.3.3	26	neg.	125	0
1.3.4	520	neg.	1650	16000
1.18	18	neg.	225	0

1.19	18	neg.	475	10000
1.18.1	600	neg.	12950	20000
1.18.2	300	neg.	475	6000
1.19.1	1800	neg.	13625	20000
1.19.2	420	neg.	1175	6000

### 3.2.2 Menetelmien raja-arvot

Fuelstat Resinae+ -pikatestimenetelmän sekä MicrobMonitor<sup>2</sup> -menetelmän käyttöohjeissa ilmoitetut raja-arvot mikrobikontaminaatiotasolle ovat yhteneväisiä IATA:n suosittelemille raja-arvoille kontaminaation tulkitsemiselle. IATA:n määrittelemissä raja-arvoissa yli 4 000 cfu/l tulos tarkoittaa kohtalaista kontaminaatiota ja yli 20 000 cfu/l tulos suurta kontaminaatiota.

Fuelstat Resinae+ -pikatestimenetelmä antaa tuloksen kontaminaatiotasoina, jotka tulkitaan testiliuskan viivojen perusteella joko negatiiviseksi, heikoksi positiiviseksi tai vahvaksi positiiviseksi. Taulukossa 4 on esitetty kontaminaatiotasojen mukaiset mikrobi-  
toisuudet mikrogrammoina per litra sekä pesäkelukumääränä per litra (cfu/l).

Taulukko 4. Fuelstat Resinae+ -menetelmän raja-arvot.

Fuelstat Resinae+	Polttoainefaasi		Vesifaasi	
	cfu/l	µg/l	cfu/ml	µg/ml
Negatiivinen	< 4 000	< 150	< 1 000	< 33
Heikko positiivinen	4 000 - 20 000	150 - 750	1 000 - 10 000	33 - 166
Vahva positiivinen	> 20 000	> 750	> 10 000	> 166

Taulukossa 5 on esitetty MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmän raja-arvot polttoaine- ja vesifaasista määritettynä. Lentopetrolille suositellulla 0,5 ml:n näytemäärällä laskennallinen pienin havaittava määritystulos on 2000 cfu/l.

Taulukko 5. MicrobMonitor2-menetelmän raja-arvot.

MicrobMonitor <sup>2</sup>	Polttoainefaasi		Vesifaasi	
	cfu	cfu/l	cfu	cfu/ml
Negatiivinen	< 2	< 4 000	< 100	< 1 000
Kohtalainen	2	4 000	100	1 000
	10	20 000	1 000	10 000
Suuri	> 10	> 20 000	> 1 000	> 10 000

HY-LITE-pikatestimenetelmän raja-arvot kontaminaatiolle (taulukko 6) on määritetty lentopetrolinäytteille, jotka ovat peräisin lentokoneen polttoainesäiliöstä. Raja-arvojen käyttöä tulosten tulkinnassa käytettiin siksi vain suuntaa-antavasti.

Taulukko 6. HY-LITE-menetelmän raja-arvot.

HY-LITE	HY-LITE <sup>®</sup> (rlu/l)	ATP (10 <sup>-12</sup> g)
Negatiivinen	< 1 000	< 5
Kohtalainen	1 000 - 5 000	5 - 25
Suuri	> 5 000	> 25

IP385-menetelmälle ei ole ilmoitettu raja-arvoja mikrobikontaminaatiotasolle. Menetelmäohjeessa on kuitenkin esitetty 95 %:n luotettavuustasot pesäkkeiden lukumäärän laskemiselle (liite 1).

### 3.3 Tulosten tarkastelu

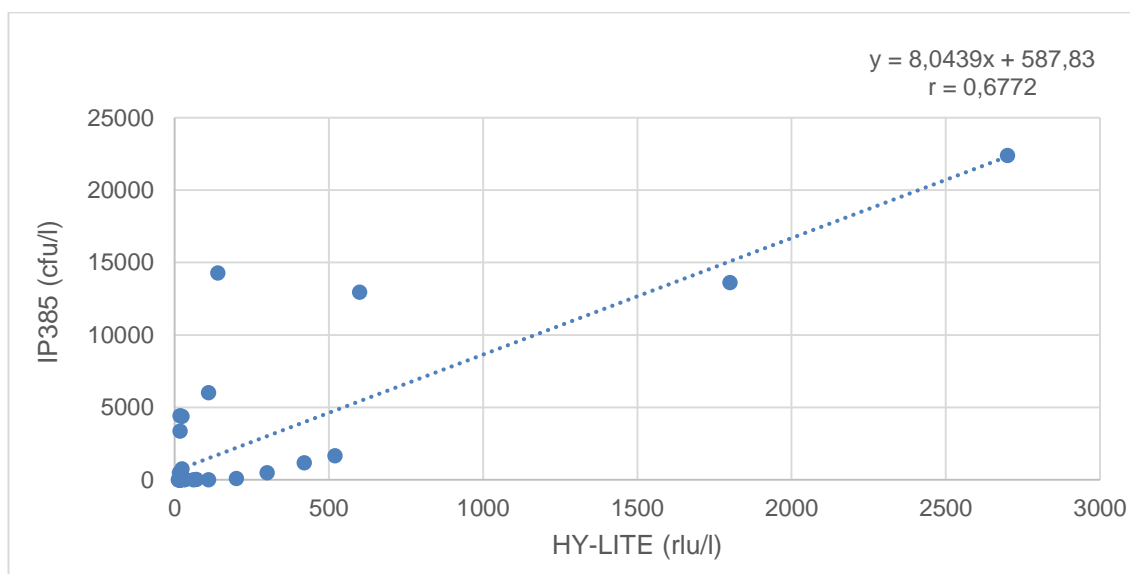
Tulosten tarkastelussa tutkittiin mitattujen tulosten perusteella menetelmien keskinäisiä riippuvuussuhteita sekä tarkasteltiin yksittäisiä mittaustuloksia. Menetelmien keskinäisiä riippuvuussuhteita havainnollistettiin hajontakaavioiden ja määritettyjen korrelaatiokerroimien avulla. Yksittäisten määritystulosten pohjalta pohdittiin menetelmien ominaisuuksia, kuten herkkyyttä ja mittaustarkkuutta. Menetelmien soveltuvuutta rutiinikäyttöön tarkasteltiin menetelmien kokonaisuuden kannalta, mihin liittyi pohdintaa menetelmien nopeudesta, helppokäyttöisyydestä sekä luotettavuudesta.

Fuelstat Resinae+ -menetelmällä saadut tulokset tulkittiin kaikki negatiivisiksi tuloksiksi yhtä näytettä lukuun ottamatta. Negatiivisten tulosten takia Fuelstat Resinae+ -menetelmän korrelaatiota muihin menetelmiin ei tutkittu. Menetelmän ainoa positiivinen tulos saatiin polttoainesäiliön vesitysnäytteestä (2.4). Vesitysnäyte oli ainoa työssä tutkittu näyte, joka muista näytteistä poiketen ei sisältänyt polttoainetta. Näyte 2.4 antoi Mic-

robMonitor<sup>2</sup>-menetelmällä poikkeuksellisen suuren tuloksen (taulukko 3), joten poikkeavana tuloksena sekä eri näytematriisin omaavana MicrobMonitori<sup>2</sup>:lla määritettyä tulosta ei huomioitu korrelaatiotarkastelussa.

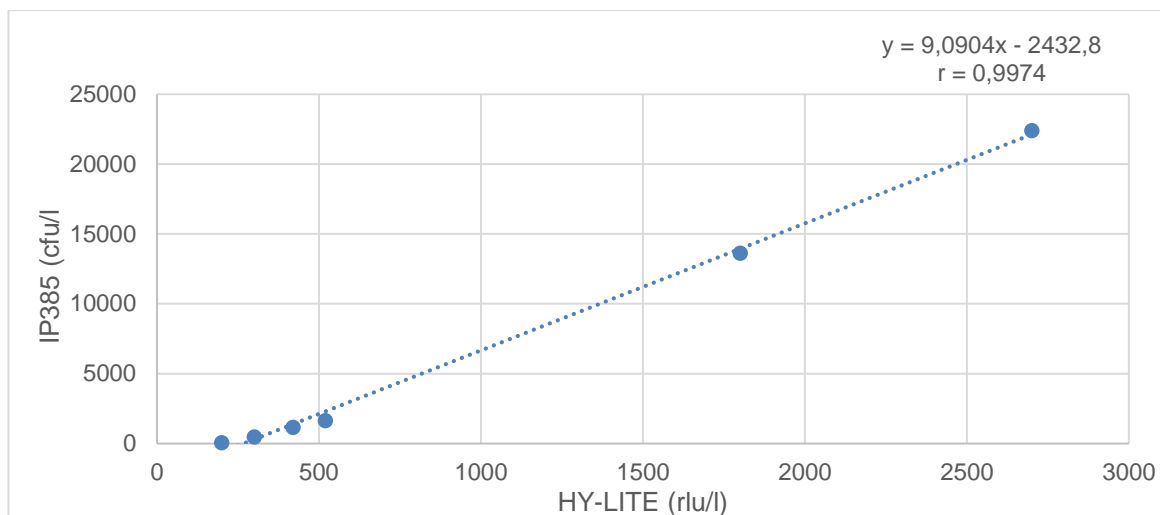
### 3.3.1 Menetelmien välinen korrelaatio

HY-LITE-menetelmän ja IP385-menetelmän välinen riippuvuussuhde on esitetty kuvassa 13 mittaustulosten hajontakaavion avulla. Korrelaatiokertoimen ( $r = 0,6772$ ) mukaan menetelmät korreloivat hieman keskenään. Korrelaation tilastollista merkitsevyyttä tarkasteltiin lasketun p-arvon avulla. Merkitsevyystasoa kuvataan p-arvolla, joka kertoo todennäköisyyden sille, että riippuvuus johtuu sattumasta. Yleisesti p-arvon ollessa pienempi kuin 0,05 (5 %) pidetään korrelaatiota tilastollisesti merkittävänä. [26] Menetelmien välisten riippuvuussuhteiden tilastollista merkitsevyyttä tarkasteltiin laskemalla p-arvot Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelman Studentin T-testin avulla. P-arvoksi määritettiin HY-LITE-menetelmän ja IP385-menetelmän riippuvuussuhteelle 0,0144, jolloin menetelmien välinen korrelaatio todettiin tilastollisesti merkitseväksi.



Kuva 13. HY-LITE:n ja IP385:n tulosten hajontakaavio.

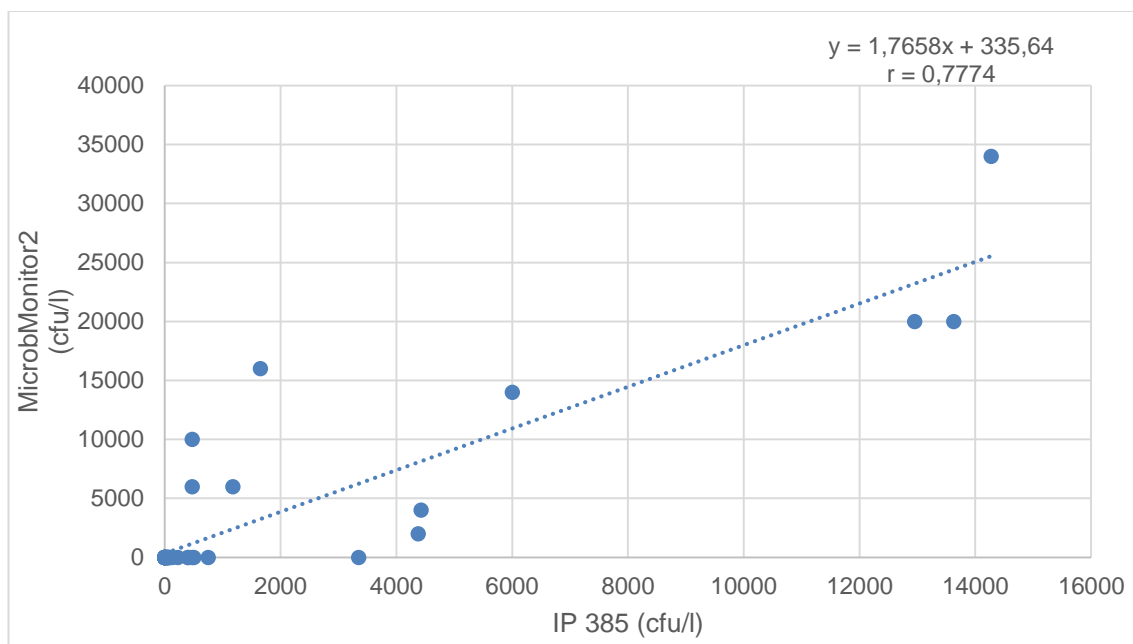
Hajontakaaviosta (kuva 13) havaittiin selkeä lineaarinen trendi kuuden näytteen määrittäytuloksilla (kuva 14). Tuloksista määritetyn kuvaajan korrelaatiokertoimen ( $r = 0,9974$ ) mukaan valituilla tuloksilla oli vahva riippuvuussuhde. Tilastollista merkitsevyyttä ei voitu havainnoida p-arvon avulla pienen otoskoon takia [27]. Käytännön merkitsevyyttä todettiin valitulla pistejoukolla olevan, sillä pistejoukko noudattaa varsin lineaarista suhdetta.



Kuva 14. Kuuden näytteen määrittystulosten hajontakaavio.

HY-LITE:n ja IP385:n määrittystuloksilla ei todettu olevan selkeää ja yhdenmukaista riippuvuutta keskenään, vaikka satunnaisilla määrittystuloksilla havaittiinkin lineaarista riippuvuutta.

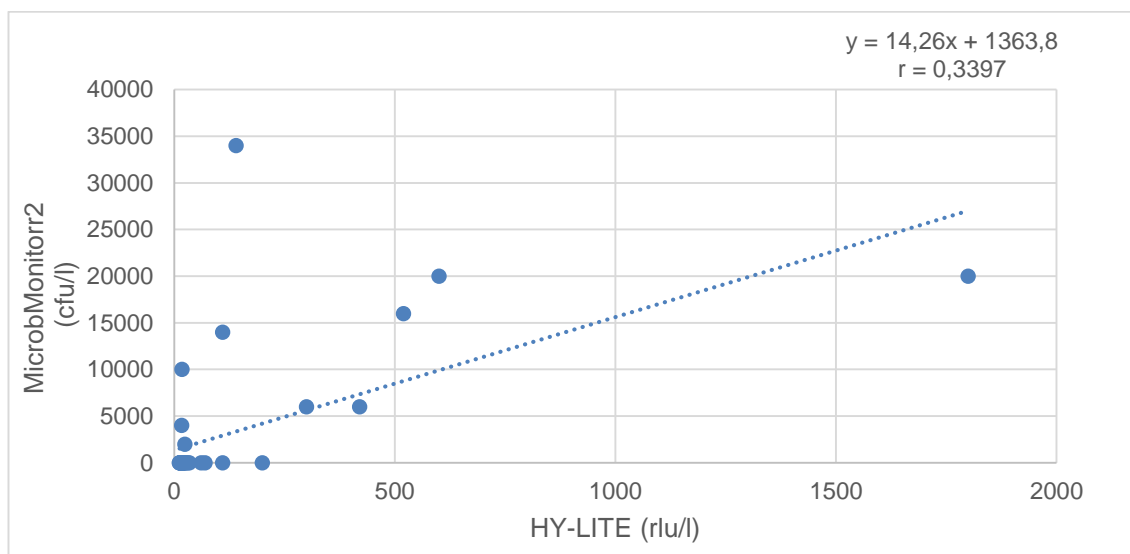
IP385:n ja MicrobMonitor<sup>2</sup>:n välistä riippuvuussuhdetta kuvaava hajontakaavio on esitetty kuvassa 15. Määrittystulosten hajontakaavion sekä korrelaatiokertoimen ( $r=0,7774$ , p-arvo 0,2204) perusteella todettiin, että menetelmien välillä ei ole selkeää ja yhdenmukaista riippuvuussuhdetta.



Kuva 15. IP385 -menetelmän ja MicrobMonitor2 -menetelmän korrelaatiota kuvaava hajontakaavio.



HY-LITE:n ja MicrobMonitor<sup>2</sup>:n välistä riippuvuussuhdetta kuvaava hajontakaavio on esitetty kuvassa 16. Korrelaatiokertoimen ( $r=0,3397$ ) mukaan menetelmillä ei määrittystulosten perusteella ole selkeää riippuvuussuhdetta.



Kuva 16. HY-LITE-menetelmän ja MicrobMonitor2-menetelmän korrelaatiota kuvaava hajontakaavio.

Mittaustulosten perusteella ei todettu menetelmien välillä johdonmukaisia riippuvuussuhteita. Menetelmien välisiin korrelaatioihin vaikuttivat muun muassa MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmän mittaustuloksen epätarkkuus, joka oli 0,5 ml:n näytemäärää käytettäessä 2000 cfu/l välein, sekä HY-LITE-menetelmän kemiallinen tausta (ATP-pitoisuuden mittaaminen) verrattuna kasvatusmenetelmiin mikrobitalon määrittämisessä. Korrelaatiotarkastelussa HY-LITE-menetelmä korreloi selkeimmin IP385-menetelmän kanssa. Näytteen sisältämälle ATP-pitoisuudelle (HY-LITE) ja kasvatusmenetelmien pesäkelukumäärien välille ei löydetty määrittystulosten perusteella suoraa yhteyttä

### 3.3.2 Menetelmiin liittyvät virhelähteet

Noin 60 % tutkituista näytteistä antoi negatiivisen tuloksen jokaisella määrittämenetelmällä. Yksittäisten mittaustulosten tarkastelussa keskityttiin näytteisiin, joissa yhdestä tai useammasta menetelmästä saatiin merkitsevä positiivinen tulos (taulukko 7). Merkitsevän positiivisella tuloksella tarkoitetaan tulosta, joka poikkeaa selvästi määrittämenetelmän nollatasosta. HY-LITE-menetelmän korkeimman mitatun nollatason (27 rlu/l) mukaan pidettiin mitattuja alle 30 rlu/l tuloksia negatiivisina tuloksina. MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmän pienin positiivinen tulos oli 2000 cfu/l käytettäessä 0,5 ml:n näytemäärää. Tällöin menetelmällä saaduista tuloksista huomioitiin kaikki negatiivisesta tuloksesta (0 cfu/l) poikkeavat tulokset. Fuelstat Resinae+ -menetelmässä pyrittiin huomioimaan

kaikki negatiivisesta tuloksesta poikkeavat tulokset. IP385-menetelmän tuloksista huomioitiin kaikki yli 10 mikrobipesäkettä sisältäneet näytteet 40 ml:n näytemäärällä. Tällöin yksittäisnäytteiden tarkasteluun otettiin näytteet, joiden mikrobipitoisuus oli yli 250 cfu/l.

Taulukossa 7 on esitetty näytteet määritystuloksineen, joissa havaittiin mikrobikasvustoa vähintään yhdellä määritysmenetelmällä.

Taulukko 7. Nollatasosta poikkeavan tuloksen omaavat näytteet.

Näyte	HY-LITE (rlu/l)	Fuelstat Resinae+	IP385 (cfu/l)	MicrobMonitor <sup>2</sup> (cfu/l)
1.11	15	neg.	475	0
1.12	17	neg.	4425	4000
1.14	24	neg.	4375	2000
1.15	17	neg.	3350	0
1.17	70	neg.	25	0
1.18.1	600	neg.	12950	20000
1.18.2	300	neg.	475	6000
1.19	18	neg.	475	10000
1.19.1	1800	neg.	13625	20000
1.19.2	420	neg.	1175	6000
1.20	24	neg.	750	0
1.21	110	neg.	6000	14000
1.22	140	neg.	14275	34000
1.3.4	520	neg.	1650	16000
2.1	19	neg.	500	0
2.2	21	neg.	400	0
2.3	17	neg.	400	0
2.4	2700	high.	22400	1,6*10 <sup>7</sup>
3.4	200	neg.	75	0
4.1.2	61	neg.	0	0
5.1.4	110	neg.	0	0

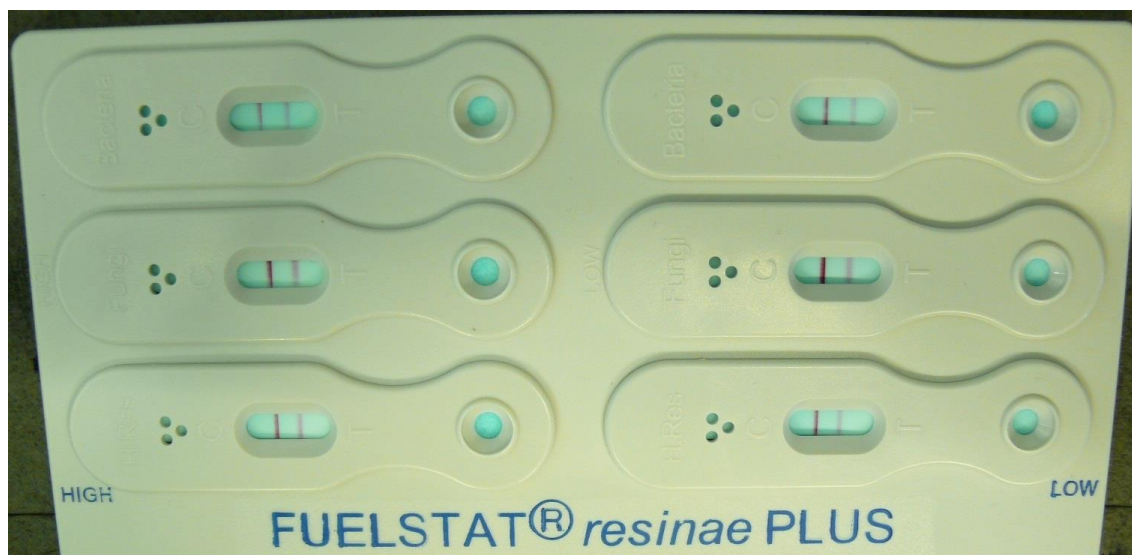
Sekä MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmän että HY-LITE-menetelmän herkkyudet yksittäisten määritystulosten (taulukko 7) perusteella olivat heikompia verrattuna IP385-menetelmään. Yhdeksässä näytteessä määritettiin IP385-menetelmällä yli 400 cfu/l mikrobipitoisuus HY-LITE-menetelmän ja MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmän tulosten ollessa nollatasossa (alle 30 rlu/l, HY-LITE ja 0 cfu/l, MicrobMonitor<sup>2</sup>).

HY-LITE:-menetelmällä mitattiin neljästä näytteestä (1.17, 3.4, 4.1.2 ja 5.1.4) nollatason ylittäviä tuloksia (yli 30 rlu/l) muiden määritysmenetelmien tulosten ollessa negatiivisia (0 cfu/l). Näistä kaksi näytettä kuuluivat rinnakkaisnäytesarjoihin, joista muista rinnak-

kaisnäytteistä mitattiin negatiiviset tulokset kaikilla määritysmenetelmillä. Syyksi poikkeaviin HY-LITE-menetelmän tuloksiin epäiltiin johtuvan likaisiksi jääneistä menetelmässä käytettävistä näytepulloista, jotka mahdollisesti sisälsivät pesun sekä alkoholikäsittelyn jälkeen ATP-jäämiä.

Fuelstat Resinae+ -menetelmän tulosten tulkinta osoittautui erittäin tulkinnanvaraiseksi ja siten hankalaksi. Testiliuskojen kontrolli- ja testiviivat näkyivät jokaisessa määrittämisessä poikkeuksena vesitysnäyte 2.4, josta tulos tulkittiin heikosti positiiviseksi (yli 4000 cfu/l). Tulosten tulkinnanvaraisuus johtui testiviivan luettavuudesta. Testikitin mukaan haalea punertava testiviiva voi joko viitata epätasaiseen näytteen virtaukseen testialustalla tai lievään mikrobikontaminaatiotasoon, joka ei kuitenkaan ylitä testin kynnysarvoa. Erittäin haalea testiviiva tulisi menetelmäohjeen mukaan tulkita positiiviseksi tulokseksi. Määrittämisessä sekä kontrolli- että testiviivat näkyivät kohtuullisen selkeästi, jolloin kaikki näytteet (pois lukien näyte 2.4) tulkittiin Fuelstat Resinae+ -menetelmällä negatiivisiksi (alle 4000 cfu/l).

Testiviivojen tummuuden sekä näkyvyyden erot todettiin ongelmalliseksi testituloksen tulkinnassa. Esimerkiksi näytteen 1.18.1 testiliuskassa (kuva 17) testiviivat erottuivat selkeästi, jolloin tulos tulkittiin negatiiviseksi. Näytteen 1.18.1 tulokset muilla määrittämis menetelmillä (taulukko 7) olivat 600 rlu/l (HY-LITE), 12 950 cfu/l (IP385) ja 20 000 cfu/l (MicrobMonitor<sup>2</sup>).



Kuva 17. Näytteen 1.18.1 tulos Fuelstat Resinae+ -testiliuskalla.

Kuvassa 18 on esitetty näytteen 1.9 Fuelstat Resinae+ -testiliuska. Näytteen 1.9 tulokset muilla määritysmenetelmillä (taulukko 3) olivat 20 rlu/l (HY-LITE), 0 cfu/l (IP385) ja 0 cfu/l (MicrobMonitor<sup>2</sup>).



Kuva 18. Näytteen 1.9 tulos Fuelstat Resinae+ -testiliuskalla.

Määritysmenetelmien tulosten ilmoitetut määritystarkkuudet erosivat toisistaan merkittävästi. MicrobMonitor<sup>2</sup>- ja Fuelstat Resinae+ -menetelmän määritystarkkuudet olivat selkeästi epätarkimpia. MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmässä käytetyllä 0,5 ml:n näytemäärällä mittaustulokset saatiin 2000 cfu/l:n tarkkuudella. Tällöin yhden pesäkkeen havaitseminen kasvatusalustalla nosti näytteen mikrobitasotulosta 2000 pesäkkeellä litraa kohden. Lisäksi MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmässä käytetty vähäinen näytemäärä lisää mittausepävarmuutta, jolloin esimerkiksi riski väärälle negatiiviselle sekä väärälle positiiviselle tulokselle kasvaa. Fuelstat Resinae+ -menetelmän määritystarkkuus oli kolmitasoinen, jossa heikosti positiiviseen tulokseen vaadittiin 4000 cfu/l:n ja vahvasti positiiviseen tulokseen 20 000 cfu/l:n mikrobipitoisuus näytteessä. Menetelmässä mikrobipitoisuudet välillä 4000 – 20 000 cfu/l luokitellaan heikosti positiiviseksi.

IP385-menetelmän mittaustarkkuus käytetyllä 40 ml:n näytemäärällä oli 25 cfu/l. Tällöin menetelmällä havaittiin vähäisetkin mikrobikontaminaatiot, joita ei aiemmin mainituilla menetelmillä pystytty havaitsemaan. Menetelmän pesäkelukumäärälaskuihin liittyi myös jonkin verran mittausvirhettä. Menetelmälle esitettyjen 95 %:n luottamustasojen (liite 1) mukaan esimerkiksi 100 pesäkettä 40 ml:n näytemäärällä määritetty näyte omaisi 2000 – 3000 cfu/l mikrobipitoisuuden 95 %:n todennäköisyydellä. Menetelmän pesäkelaskuissa havaittiin virhelähteiksi muun muassa pesäkkeiden mikrobityyppien tunnistamisen vaikeus, mikä vaikutti määritystuloksiin.

HY-LITE-menetelmän vertailu muihin määrittämenetelmiin tuotti ongelmia osaksi menetelmällä saatujen vaihtelevien tulosten takia, mutta myös menetelmän erilaisen kemiallisen perustan ja siten eri tulosityksikön takia. Tulokset sisälsivät merkittävässä määrin sekä vääriä negatiivisia että vääriä positiivisia tuloksia verrattuna maljakasvatusmenetelmä IP385:een. Väärät negatiiviset tulokset voivat selittyä menetelmässä käytetyn reagenssikynän toimimattomuudella, jolloin reagenssikynän sisältämät bioluminesenssireaktioon tarvittavat reagenssit eivät sekoittuneet ja siten määrittästulos jäi nollassa.

### 3.3.3 Menetelmien soveltuvuus rutiinikäyttöön

Rutiinikäyttöön soveltuvimman mikrobimäärittämenetelmän selvittämisessä vertailtiin säännölliselle määrittäkselle tärkeitä kriteerejä. Näitä kriteerejä olivat menetelmän helppokäyttöisyys, nopeus sekä herkkyys. Vertailussa tarkasteltiin myös menetelmien soveltuvuutta kenttäolosuhteisiin.

Pikatestimenetelmät (HY-LITE, Fuelstat Resinae+) olivat pikatesteille tyypillisesti helppokäyttöisiä ja nopeita. Kenttäolosuhteisiin eli laboratorioympäristön ulkopuolella suoritettaviin määrittäksiin Fuelstat Resinae+ -menetelmä sopisi selkeästi parhaiten menetelmässä käytettävän pienen näytemäärän sekä yksinkertaisen ja nopean määrittäksen ansiosta. HY-LITE-menetelmän haittoina verrattuna Fuelstat Resinae+ -menetelmään oli kohtuullisen suuri näytemäärä sekä määrittäksessä tarvittava luminometri sekä erillinen näytepullo. Pikatestien ehdottomiin etuihin lukeutuivat tulosten saaminen heti määrittäksen jälkeen, jolloin menetelmät soveltuisivat esimerkiksi akuutteihin mikrobikontaminaatioepäilyihin, joissa kontaminaation toteaminen halutaan tietää mahdollisimman nopeasti. Saatujen tulosten perusteella Fuelstat Resinae+ -menetelmää ei voitu pitää luotettavana menetelmänä. Tulosten perusteella HY-LITE-menetelmällä pystyttiin havaitsemaan korkeita mikrobipitoisuuksia melko hyvin, jolloin pikatestiä voisi mahdollisesti käyttää tilanteissa, joissa epäillään polttoaineen korkeaa mikrobikontaminaatiota. Menetelmällä saatiin kuitenkin kohtuullisesti IP385-menetelmästä poikkeavia tai päinvastaisia tuloksia, joten pelkästään HY-LITE-menetelmän käyttöä mikrobimäärittäksessä ei suositella.

Kasvatusmenetelmät (IP385, MicrobMonitor<sup>2</sup>) vaativat useamman vuorokauden inkubaatioajan, jolloin määrittämenetelmien haittoihin lukeutuivat tulosten saamisen hitaus. Tällöin kasvatusmenetelmät eivät sovellu tilanteisiin, joissa kontaminaatio halutaan todeta mahdollisimman nopeasti. MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmän etuja olivat itse määrittäseen kuluva lyhyt aika sekä tarvittava vähäinen näytemäärä. Analyysin todettiin olevan vertailtavista menetelmistä helpoin sekä nopein. Vaikka menetelmä perustuu mikrobien

kasvattamiseen tietyssä inkubaatiolämpötilassa, pohdittiin itse analyysin suorittamisen olevan mahdollista myös kenttäolosuhteissa.

IP385-menetelmän määrittäminen edellytti laboratorio-osaamista sekä laboratorioympäristön, joka pitää sisällään muun muassa steriilejä mittavälineitä sekä laminaarin. Menetelmä oli vertailtavista menetelmistä selkeästi työläisempi, ja se vei eniten aikaa. IP385-menetelmän etuina olivat paras tulostarkkuus sekä luotettavuus. Menetelmien luotettavuutta pohdittiin tulosten, menetelmien virhelähteiden sekä teoreettisten taustojen pohjalta. IP385-menetelmän todettiin olevan vertailtavista menetelmistä herkin sekä luotettavin. Taulukossa 8 on esitetty näkemys vertailtavien menetelmien ominaisuuksista.

Taulukko 8. Arvio vertailtavista menetelmistä asteikolla 1 - 5. 1 = erittäin huono, 5 = erinomainen.

	HY-LITE	Fuelstat Resinae+	IP385	Microb-Monitor <sup>2</sup>
<b>Määrittämiseen kuluva aika</b>	5	5	1	1
<b>Analyysin suoritushelppeys</b>	3	4	2	5
<b>Soveltuvuus kenttäolosuhteisiin</b>	4	5	1	3
<b>Herkkyyden (tulokset)</b>	2	1	5	3
<b>Luotettavuus (tulokset)</b>	2	1	5	2
<b>Kokonaisuus</b>	3	1	4	2

IP385-menetelmän todettiin olevan polttoaineiden mikrobipitoisuuksien monitorointiin parhaiten soveltuva määrittämenetelmä. Myös HY-LITE-menetelmän käyttöönottoa pohdittiin menetelmän helppokäyttöisyyden ja nopeuden takia. Tulosten perusteella HY-LITE:n luotettavuutta ei kuitenkaan pidetty tarpeeksi hyvänä rutiinikäyttöön.

Toimintatavaksi mikrobimäärittäykseen liittyen ehdotettiin seuraavaa: Rutiininomaiset mikrobimäärittäykset (monitorointi) suoritetaan IP385-menetelmällä. Äkillisessä mikrobikontaminaatioepäilyssä näytteestä suoritetaan sekä IP385-menetelmän mukainen mikrobimäärittäminen että HY-LITE-menetelmän mukainen pikatestimäärittäminen. Tällöin pikatestistä saadun tuloksen perusteella voidaan ryhtyä mahdollisen mikrobikontaminaation edellyttämiin toimenpiteisiin lyhemmällä viiveajalla ennen varsinaisen tuloksen (IP385-menetelmän) tulkintaa, joka suoritetaan viiden vuorokauden jälkeen näytteenotosta.

HY-LITE-menetelmälle ei pystytty määrittämään tarkkaa raja-arvoa korkealle mikrobipitoisuudelle. Kuitenkin työssä määritettyjen tulosten perusteella esimerkiksi yli 500 rlu/l HY-LITE-menetelmällä mitattu tulos viittasi polttoainenäytteen korkeaan mikrobipitoisuuteen kasvatusmenetelmien mukaan. Tällöin HY-LITE-menetelmällä määritetyn mittaus-tuloksen ylittäessä sovitun raja-arvon voitaisiin kontaminaatioepäily todeta varmaksi kohtuullisella todennäköisellä.

## 4 Yhteenveto

Opinnäytetyön päätavoitteena oli selvittää neljästä vertailusta mikrobimääritysmenetelmästä käyttötarkoitukseensa parhaiten soveltuva testimenetelmä. Vertailun yhteydessä suoritettiin suunniteltu laaja polttoainesäiliöiden monitorointi mikrobimääritysten osalta. Menetelmien vertailua tehtiin tulosten sekä käyttökokemuksen pohjalta. Mikrobimäärityksiä suoritettiin yhteensä 46 eri polttoainenäytteestä.

Maljakasvatusmenetelmä IP385 osoittautui vertailun perusteella soveltuvimmaksi mikrobimääritysmenetelmäksi. Kasvatusmenetelmässä käytettävä viiden vuorokauden inkubaatioaika estää kuitenkin nopean kontaminaatiotason määrittämisen. Tästä syystä HY-LITE-pikatestimenetelmä voisi toimia suuntaa antavana testimenetelmänä IP385-menetelmän rinnalla, jolloin äkillisissä, korkean kontaminaatiotason epäilyissä saataisiin nopeasti varmistus epäilylle, ja mahdollisiin toimenpiteisiin voitaisiin ryhtyä välittömästi. HY-LITE-menetelmällä saatuja mittaustuloksia tulisi kuitenkin tulkita varauksella, sillä menetelmän tuloksissa havaittiin melko paljon mahdollisia vääriä negatiivisia sekä vääriä positiivisia määrittystuloksia.

MicrobMonitor<sup>2</sup>-menetelmällä saatiin määritettyä jokseenkin yhtäläisiä tuloksia polttoainenäytteistä IP385-menetelmän kanssa, mutta menetelmän tulostarkkuutta sekä pitkää inkubaatioaikaa pidettiin heikkoina, jolloin etuja käytössä olevaan IP385-menetelmään verrattuna ei ollut. Pikatestimenetelmistä Fuelstat Resinae+ -menetelmä todettiin helpokäyttöiseksi sekä nopeaksi, mutta menetelmän tulosten tulkintaa kuvailtiin erittäin tulokinnanvaraiseksi ja haastavaksi.

Opinnäytetyön laboratorio-osuus onnistui sekä aikataulullisesti että määritysten suhteen hyvin. Menetelmien vertailuun liittyvä määrittystulosten tulkinta ja tarkastelu osoittautuivat haastaviksi osaksi polttoainenäytteiden puhtauden vuoksi, mutta enimmäkseen mikrobiologisiin määrittäisiin liittyvän mittausepävarmuuden takia. Mikrobimääritysmenetelmiin liittyvistä tulosten vaihteluista ja virhelähteistä opittiin hyvinkin konkreettisesti työn ansiosta.

## Lähteet

- 1 Pitcher, D.G. 1989. *Industrial Case Histories of Microbiological Fuel Contamination – Cause, Effect and Treatment*. Lontoo: Elsevier Ltd.
- 2 Hill, Edward C. & Hill, Graham C. 2008. *Microbial Contamination and Associated Corrosion In Fuels, During Storage, Distribution and Use*. Cardiff: ECHA Microbiology.
- 3 Neste Oyj. 2015. *Suomen jalostamokokonaisuus* –luentokalvot. Suomen\_tuotanto\_2015.pptx. Viitattu 29.9.2015.
- 4 Hill, Ted. 2003. *Microbial growth in aviation fuel*. Aircraft Engineering and Aerospace Technology. Vol 75. Num 5. s. 497-502
- 5 Conidia Bioscience Ltd. *FUELSTAT™ Diesel Test Kits. For the Rapid Detection of Microbial Contamination in Diesel & Biodiesel Fuel*.
- 6 Gaylarde, Christine C. & Bento, Fatima M. & Kelley, Joan. 1999. *Microbial Contamination of Stored Hydrocarbon Fuels and Its Control*. São Paulo: Revista de Microbiologia.
- 7 Saastamoinen, Heidi. 2011. Diplomityö: *Mikrobit polttoaineen varastoinnissa ja jakelussa*. Tampereen teknillinen yliopisto.
- 8 Seifert, K.A. Hughes, S.J. Boulay, H. Louis-Seize, G. *Fig1. Taxonomy, nomenclature and phylogeny of three cladosporium-like hyphomycetes, Sorocybe resinae, Seifertia azaleae and the Hormoconis anamorph of Amorphantheca resinae*. Verkko-dokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104743>> Viitattu 31.3.2015
- 9 Genozymes Project Public Genomes. <[http://genome.fungalgenomics.ca/species/Amorphantheca\\_resinae\\_final\\_img.html](http://genome.fungalgenomics.ca/species/Amorphantheca_resinae_final_img.html)> Viitattu 31.3.2015.
- 10 Seifert, K.A. Hughes, S.J. Boulay, H. Louis-Seize, G. *Taxonomy, nomenclature and phylogeny of three cladosporium-like hyphomycetes, Sorocybe resinae, Seifertia azaleae and the Hormoconis anamorph of Amorphantheca resinae*. Verkko-dokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104743/figure/fig1/>> Viitattu 31.3.2015
- 11 Neste Oyj. 2015. Rikkivety. Käyttöturvallisuustiedotteet – KTTR. Sisäinen järjestelmä.
- 12 Turvallisuus- ja kemikaalivirasto. *Biosidit*. Verkkodokumentti. <<http://www.tukes.fi/biosidit>> Viitattu 30.3.2015.
- 13 Passman, Frederick J. 2003. *Fuel and Fuel System Microbiology - Fundamentals, Diagnosis and Contamination Control*. Mayfield: ASTM International. s.90



- 14 Groysman, A. 2014. *Corrosion in Systems for Storage and Transportation of Petroleum Products and Biofuels – Identification, Monitoring and Solutions*. Springer.
- 15 Energy Institute. 2013. EI/JIG Standard 1530: *Quality assurance requirements for the manufacture, storage and distribution of aviation fuels to airports*. 1. painos.
- 16 ASTM International. D7847-12. 2015. *Standard Guide for Interlaboratory Studies for Microbiological Test Methods*.
- 17 ECHA Microbiology Ltd. *Routine Monitoring of Aviation Fuels in Supply and Distribution Facilities, Airport Depots and Into-plane Operations with MicrobMonitor2. Technical Guide*.
- 18 Encyclopædia Britannica Inc. *Thixotropy*. Written by: The Editors of Encyclopædia Britannica. Verkkodokumentti. <<http://global.britannica.com/science/thixotropy>> Viitattu 30.9.2015.
- 19 The Free Encyclopedia. Wikipedia. *Thixotropy*. Verkkodokumentti. <<https://en.wikipedia.org/wiki/Thixotropy>> Viitattu 30.9.2015.
- 20 IP385/99. 1999. *Determination of the viable aerobic microbial content of fuels and fuel components boiling below 390 °C – Filtration and culture method*. Institute of Petroleum.
- 21 UC Davis ChemWiki. Verkkodokumentti. <[http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological\\_Chemistry/Biochemical\\_Energy/ATP%2F%2FADP](http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological_Chemistry/Biochemical_Energy/ATP%2F%2FADP)> Viitattu 30.9.2015.
- 22 Wikimedia Commons. ATP Chemical Structure. Verkkodokumentti. <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATP\\_chemical\\_structure.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATP_chemical_structure.png)> Viitattu 30.9.2015.
- 23 ASTM International. D7463-14A. *Standard Test Method for Adenosine Triphosphate (ATP) Content of Microorganisms in Fuel, Fuel/Water Mixtures, and Fuel Associated Water*.
- 24 ASTM International. D7464-14. 2014. *Standard Practice for Manual Sampling of Liquid Fuels Associated Materials and Fuel System Components for Microbiological Testing*.
- 25 ASTM International. D4057-95. 1995. *Standard Practice for Manual Sampling of Petroleum and Petroleum Products*.
- 26 Heikkilä, T. *Tilastollinen tutkimus*. Edita. Verkkodokumentti. <<http://www.tilastollinentutkimus.fi/5.SPSS/Riippuvuudet.pdf>> Viitattu 9.9.2015.
- 27 Taanila, A. *Akin menetelmäblogi*. Verkkodokumentti. <<https://tilastoapu.wordpress.com/2011/11/01/10-korrelaatio-ja-sen-merkitsevyys/>> Viitattu 27.10.2015.

**IP385/99-menetelmän luottamusvälitaulukko 95 %:n luottamustasolla**

<b>Laskettu pesäkelukumäärä</b>	<b>95 %:n luottamusväli</b>
200	172 - 228
100	80 - 120
80	62 - 98
50	36 - 64
30	19 - 41
20	11 - 29
16	8 - 24
10	4 - 16
6	1 - 11